

TESIS CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA BASADA EN  
MEDICIONES DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA PARA LA  
DISCRIMINACIÓN *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS  
CANCEROSAS Y NO CANCEROSAS

Fabián Eduardo Giana  
Doctorando

Dra. Mariela I. Bellotti  
Director

Dr. Fabián J. Bonetto  
Co-director

Agosto de 2018

Laboratorio de Cavitación y Biotecnología – Centro Atómico Bariloche

Instituto Balseiro  
Universidad Nacional de Cuyo  
Comisión Nacional de Energía Atómica  
Argentina

*A la memoria de María Elena, Elisa Juana y Esteban Pascual,  
siempre en mi corazón.*

# Resumen

El contenido de este trabajo abarca el desarrollo y la implementación de una técnica que permite discriminar células normales de cancerosas a partir de mediciones de impedancia eléctrica de cultivos celulares *in vitro*.

La primera parte de esta investigación se enfoca en el análisis de cultivos celulares individuales, es decir, de células normales y cancerosas por separado, empleando microelectrodos comerciales para las mediciones. En primer lugar, se estudia el proceso de muerte celular en ensayos de herida y cicatrización a partir de mediciones de impedancia eléctrica. Para ello, se desarrolla una técnica de medición que permite registrar la dinámica de la muerte celular inducida por corrientes eléctricas elevadas, y se extrae información relevante para el objetivo de discriminación propuesto. Luego, en base a una serie de ensayos realizados sobre células normales y cancerosas, se diseña un conjunto de mediciones que permiten extraer parámetros característicos de ambas y se desarrolla un protocolo de medición separado en 4 fases asociadas a diferentes estados de un cultivo celular *in vitro*: crecimiento, confluencia, herida y cicatrización. Utilizando el conjunto de parámetros característicos más relevantes, se emplea un algoritmo de aprendizaje automático para discriminar entre células normales y cancerosas y se analizan los errores cometidos. Los resultados muestran que la técnica desarrollada es muy efectiva.

En la segunda parte del trabajo, se desarrolla un sistema de medición destinado a analizar cultivos celulares mixtos, es decir, de células normales y cancerosas mezcladas. En primer lugar, se describe el diseño y la fabricación de arreglos de microelectrodos adecuados para las mediciones propuestas. Se presentan resultados de mediciones realizadas con microelectrodos fabricados con el material estándar oro y también las primeras mediciones realizadas con una aleación de oro/cobre. A su vez, se desarrolla un protocolo detallado de micro-fabricación que se espera pueda ser utilizado como base para trabajos futuros. Luego, se implementa la técnica desarrollada en la primera parte del trabajo para discriminar células normales de cancerosas en cultivos individuales utilizando los microelectrodos fabricados, y se estudia el efecto del tamaño de los mismos en la capacidad discriminante. Finalmente, se emplean estos resultados para evaluar la detección de células cancerosas en un cultivo mixto que contiene también células normales. En base a los resultados obtenidos, se propone un indicador que podría ser utilizado como soporte en el proceso de diagnóstico de cáncer.

**Palabras clave:** Espectroscopia de Impedancia Eléctrica Celular, bioimpedancia, discriminación celular, cáncer, microelectrodos biocompatibles.

# Abstract

The content of this work covers the development and implementation of a technique based on electrical impedance measurements to discriminate between normal and cancerous cells cultured *in vitro*.

The first part of this research focuses on the analysis of individual cell cultures, i.e. of normal and cancerous cells separately, using commercial microelectrodes for carrying out the measurements. First, the process of cell death during impedance-based wound-healing assays is studied. For this purpose, a measurement technique is developed that allows to register the cell death dynamics induced by high electric currents. Relevant information is thus extracted which results useful to achieve discrimination between different cell types. Then, based on a series of tests performed on normal and cancerous cells, a set of measurements is designed to extract characteristic parameters of both cell types and a measurement protocol is developed. This protocol is divided in 4 phases associated with different states of an *in vitro* cell culture: growth, confluence, wound and healing. Using the most relevant set of characteristic parameters, a machine learning algorithm is employed to discriminate between normal and cancerous cells. The results show that the developed technique is very effective.

The second part of this work covers the development of a measurement system designed to analyze mixed cell cultures, i.e. of normal and cancerous cells together. First, the design and manufacture of microelectrode arrays suitable for the proposed measurements are described. Results of measurements carried out on microelectrodes made of gold (standard material) and gold/copper (alternative material) are presented. In addition, a detailed microfabrication protocol is developed that is expected to be used as a basis for future work. Then, the technique developed in the first part of the work to discriminate between normal and cancerous cells in individual cultures is implemented with the manufactured microelectrodes, and the effect of their size on the discriminant capacity is studied. Finally, these results are used to evaluate the detection of cancer cells in a mixed culture. Based on the results obtained, an indicator is proposed that could be used as support on cancer diagnostic procedures.

**Keywords:** Electric Cell-substrate Impedance Sensing, cell discrimination, cancer, biocompatible microelectrodes.

# Índice de contenidos

Glosario de términos y abreviaturas	viii
<b>A Introducción</b>	<b>1</b>
<b>A.1 Aspectos básicos sobre el cáncer</b>	<b>2</b>
A.1.1 Células normales y cancerosas . . . . .	2
A.1.2 Cáncer y transformación celular . . . . .	2
A.1.3 Incidencia del cáncer en Argentina . . . . .	3
A.1.4 Diagnóstico de cáncer . . . . .	4
<b>A.2 Espectroscopia de impedancia eléctrica celular</b>	<b>7</b>
A.2.1 Descripción de la técnica y aplicaciones . . . . .	7
A.2.2 Respuesta eléctrica de microelectrodos desnudos . . . . .	9
A.2.3 Respuesta eléctrica de microelectrodos cubiertos: modelo de Giaever y Keese	11
A.2.4 Micromovimiento . . . . .	16
A.2.5 Ensayos de herida y cicatrización . . . . .	17
A.2.6 La técnica ECIS en el diagnóstico de cáncer . . . . .	21
<b>A.3 Objetivos de este trabajo</b>	<b>24</b>
A.3.1 Objetivo general . . . . .	24
A.3.2 Objetivos específicos . . . . .	24
<b>B Análisis de cultivos celulares individuales</b>	<b>25</b>
<b>B.1 Materiales y métodos experimentales</b>	<b>26</b>
B.1.1 Medición de impedancia eléctrica . . . . .	26
B.1.2 Líneas celulares . . . . .	34
B.1.3 Técnicas de cultivo . . . . .	36
<b>B.2 Ensayos de herida y cicatrización</b>	<b>38</b>
B.2.1 Resumen . . . . .	38

B.2.2	Introducción . . . . .	39
B.2.3	Materiales y métodos . . . . .	40
B.2.4	Análisis de impedancia de células MDCK . . . . .	42
B.2.5	Respuesta eléctrica a diferentes voltajes . . . . .	45
B.2.6	Dinámica de la muerte celular . . . . .	48
B.2.7	Correlación entre mediciones a bajo y alto voltaje . . . . .	52
B.2.8	Conclusiones . . . . .	54
<b>B.3</b>	<b>Discriminación entre células normales y cancerosas</b>	<b>56</b>
B.3.1	Resumen . . . . .	56
B.3.2	Introducción . . . . .	57
B.3.3	Materiales y métodos . . . . .	59
B.3.4	Resultados experimentales . . . . .	62
B.3.5	Técnica de discriminación . . . . .	71
B.3.6	Conclusiones . . . . .	76
<b>C</b>	<b>Análisis de cultivos celulares mixtos</b>	<b>78</b>
<b>C.1</b>	<b>Desarrollo de microelectrodos para mediciones de impedancia en cultivos celulares</b>	<b>79</b>
C.1.1	Resumen . . . . .	79
C.1.2	Introducción . . . . .	80
C.1.3	Técnicas de microfabricación utilizadas . . . . .	81
C.1.4	Desarrollo de arreglos de microelectrodos . . . . .	86
C.1.5	Resultados experimentales . . . . .	101
C.1.6	Conclusiones . . . . .	107
<b>C.2</b>	<b>Detección de células cancerosas en cultivos mixtos</b>	<b>108</b>
C.2.1	Resumen . . . . .	108
C.2.2	Introducción . . . . .	108
C.2.3	Materiales y métodos . . . . .	110
C.2.4	Resultados experimentales . . . . .	112
C.2.5	Conclusiones . . . . .	119
<b>D</b>	<b>Conclusiones y trabajos futuros</b>	<b>121</b>
<b>I</b>	<b>Protocolos de siembra y preservación de células</b>	<b>124</b>
<b>II</b>	<b>Ajuste de datos al modelo de Giaever y Keese</b>	<b>128</b>

---

III	Determinación del estado estacionario en curvas de siembra, herida y cicatrización	130
IV	Protocolo de fabricación de MEAs en el Centro Atómico Bariloche	132
V	Diseño y construcción de un circuito selector de canales para mediciones ECIS	145
	Bibliografía	149
	Agradecimientos	157



# Glosario de términos y abreviaturas

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
ECIS	Espectroscopia de impedancia eléctrica celular (Electric Cell-substrate Impedance Sensing).
FBS	Fetal Bovine Serum.
IOBA	Células epiteliales normales de conjuntiva humana (Instituto Oftalmológico Barcelona).
LDA	Linear Discriminant Analysis.
LIA	Lock-in Amplifier.
LM3	Células epiteliales transformadas de adenocarcinoma de glándula mamaria de ratón (Murine Mammary Adenocarcinoma).
LPF	Low-pass filter.
MDCK	Células epiteliales normales de riñón canino (Madin-Darby Canine Kidney).
MEA	Arreglo de microelectrodos ( <i>Microelectrode Array</i> ).
MW1	<i>Multiwell</i> comercial de Applied Biophysics, con microelectrodos simples y conexión PCI.
MW2	<i>Multiwell</i> comercial de Applied Biophysics, con microelectrodos dobles y conexión mediante pines retráctiles.
NMuMG	Células epiteliales normales de glándula mamaria de ratón (Normal Murine Mammary Gland).
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis).
PCB	Placa de circuito impreso (Printed Circuit Board).
PCI	Peripheral Component Interconnect.
PLL	Phase-locked Loop.
PMP	Placa de matriz de puntos.
RIE	Reactive Ion Etching.
WH	Ensayo de herida y cicatrización ( <i>wound-healing</i> assay)
WxEy	Biosensor con $x$ wells e $y$ microelectrodos por cada well.

# Índice de figuras

A.2.1	Arreglo de microelectrodos para mediciones ECIS. . . . .	8
A.2.2	Respuesta en frecuencia de un microelectrodo ECIS vs. circuitos RC serie y paralelo. . . . .	10
A.2.3	Respuesta eléctrica de un microelectrodo desnudo. . . . .	11
A.2.4	Fundamentos de la técnica ECIS. . . . .	12
A.2.5	Efecto de la frecuencia de medición sobre la impedancia del sistema. . . . .	13
A.2.6	Respuesta eléctrica de microelectrodos cubiertos: ajuste según el modelo GK. . . . .	16
A.2.7	Micromovimiento celular durante el estado de confluencia. . . . .	17
A.2.8	Ensayo de herida y cicatrización eléctrico. . . . .	19
A.2.9	Micrografías de un experimento de herida y cicatrización. . . . .	20
A.2.10	Análisis PCA del <i>micromotion</i> para células normales y cancerosas. . . . .	22
B.1.1	Fotografía del <i>multiwell</i> MW1. . . . .	26
B.1.2	Dispositivo MW1: fotografía de un <i>well</i> . . . . .	27
B.1.3	Dispositivo MW1 montado en su soporte. . . . .	28
B.1.4	Dispositivo MW2: fotografía de un <i>well</i> . . . . .	29
B.1.5	Esquema de medición ECIS estándar. . . . .	30
B.1.6	Funcionamiento del amplificador <i>lock-in</i> . . . . .	31
B.1.7	Esquema alternativo de medición ECIS. . . . .	33
B.1.8	Fotografía del arreglo experimental. . . . .	33
B.1.9	Micrografías de las líneas celulares NMuMG y LM3. . . . .	36
B.2.1	Señal utilizada para registrar la dinámica de la muerte celular. . . . .	41
B.2.2	Curvas de crecimiento de células MDCK empleando el sistema de medición alternativo. . . . .	43
B.2.3	Espectros de resistencia y capacidad de células MDCK medidos con el esquema ECIS alternativo. . . . .	44
B.2.4	Barrido de bajo voltaje en células MDCK. . . . .	46
B.2.5	Barrido de alto voltaje en células MDCK. . . . .	47
B.2.6	Ensayo de herida y cicatrización típico. . . . .	49
B.2.7	Dinámica de la muerte celular: primera estrategia de medición. . . . .	50
B.2.8	Dinámica de la muerte celular: segunda estrategia de medición. . . . .	51

B.2.9	Correlación entre mediciones de impedancia a bajo y alto voltaje. . . . .	53
B.3.1	Protocolo de medición para la discriminación entre células normales y can- cerosas. . . . .	61
B.3.2	Dinámica de la fase de crecimiento. . . . .	63
B.3.3	Espectros de impedancia en la fase de confluencia. Ajustes con el modelo de Giaever y Keese. . . . .	66
B.3.4	Evolución temporal de la resistencia y la capacidad durante la fase de herida. . . . .	67
B.3.5	Dinámica de la muerte celular: comparación entre células normales y cancerosas. . . . .	68
B.3.6	Dinámica de la fase de cicatrización. . . . .	70
B.3.7	Frontera de discriminación entre células NMuMG y LM3. . . . .	76
C.1.1	Fundamentos de la deposición por <i>sputtering</i> . . . . .	84
C.1.2	Curvas de calibración para la deposición mediante <i>sputtering</i> . . . . .	87
C.1.3	Etapas de microfabricación de un MEA. . . . .	92
C.1.4	Determinación del área efectiva de un microelectrodo. . . . .	93
C.1.5	Máscara para fotolitografía: W1E1. . . . .	95
C.1.6	Máscara para fotolitografía: W4E1. . . . .	96
C.1.7	MEA W4E1 con sus conexiones. . . . .	97
C.1.8	Máscara para fotolitografía: W1E20. . . . .	98
C.1.9	Conector para el MEA W1E20: conexiones eléctricas. . . . .	99
C.1.10	Conector para el MEA W1E20: soporte estructural. . . . .	100
C.1.11	MEA W1E20 con sus conexiones. . . . .	100
C.1.12	Máscara para fotolitografía: W1E100. . . . .	101
C.1.13	Espectros de impedancia de diferentes tipos de microelectrodos desnudos. . . . .	102
C.1.14	Curvas de crecimiento de células MDCK en electrodos de AuCu. . . . .	104
C.1.15	Respuesta espectral de células MDCK en electrodos de AuCu. . . . .	105
C.1.16	Espectros normalizados de células MDCK en electrodos de AuCu. . . . .	106
C.2.1	Frontera de discriminación entre células NMuMG y LM3 para MEAs W1E20 fabricados con microelectrodos de 50 $\mu\text{m}$ y 200 $\mu\text{m}$ de diámetro. . . . .	117
C.2.2	Clasificación de diferentes muestras provenientes de un mismo cultivo mixto a partir del algoritmo de discriminación. . . . .	118
III.1	Determinación del inicio del régimen estacionario. . . . .	131
V.1	Diagrama esquemático de la selección de microelectrodos mediante un de- multiplexor. . . . .	146
V.2	Diagrama esquemático del circuito selector de canales completo. . . . .	147
V.3	Ganancia del circuito selector de canales. . . . .	148

# Índice de tablas

A.1.1	Distribución de casos incidentes de cáncer en Argentina en el año 2012. . . .	4
B.2.1	Parámetros de la correlación entre valores de impedancia medidos a alto y bajo voltaje en un ensayo WH. . . . .	54
B.3.1	Valores de los parámetros característicos de células normales y cancerosas obtenidos mediante el protocolo de discriminación. . . . .	72
B.3.2	Capacidad discriminante de los parámetros característicos en función de los <i>tests</i> F, t y KS. . . . .	73
C.1.1	Resumen del protocolo de microfabricación de MEAs para mediciones ECIS.	91
C.1.2	Diámetro equivalente de microelectrodos fabricados en este trabajo. . . . .	94
C.2.1	Resultados obtenidos en mediciones de cultivos de células NMuMG y LM3 con microelectrodos de 200 $\mu\text{m}$ empleando MEAs W1E20. . . . .	113
C.2.2	Resultados obtenidos en mediciones de cultivos de células NMuMG y LM3 con microelectrodos de 50 $\mu\text{m}$ empleando MEAs W1E20. . . . .	114
C.2.3	Resultados de los <i>tests</i> F, t y KS para MEAs con microelectrodos de 200 $\mu\text{m}$ y 50 $\mu\text{m}$ de diámetro. . . . .	116
I.1	Protocolo de congelamiento de células. . . . .	126

# Parte A

## Introducción

# Capítulo A.1

## Aspectos básicos sobre el cáncer

### A.1.1. Células normales y cancerosas

Se llama célula a la unidad más pequeña que puede considerarse viva. Las células constituyen todos los organismos vivos y definen su morfología y funcionalidad. A lo largo de esta tesis, se emplearán los términos “células cancerosas” para hacer referencia a células que están asociadas al cáncer y “células normales” para hacer referencia a células no cancerosas. El núcleo del presente trabajo consiste en el desarrollo e implementación de una técnica de discriminación entre células normales y cancerosas, la cual está basada en mediciones de impedancia eléctrica de cultivos celulares *in vitro*. En esta primera parte se introducen los conceptos básicos utilizados a lo largo de esta tesis y se brinda información relacionada con el cáncer y su diagnóstico.

### A.1.2. Cáncer y transformación celular

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células” [1]. El cáncer es una enfermedad que se origina en los componentes más elementales del organismo: las células. Como tal, el término cáncer hace referencia a un amplio grupo de patologías que tienen un origen común, a saber, la transformación celular. En el proceso de generación del cáncer, ciertas células normales sufren alteraciones a nivel genético y se transforman en cancerosas. En este nuevo estado, las mismas presentan cambios en su comportamiento individual que, de extenderse a un gran número de células, se traducen en trastornos más generales que pueden derivar en serias complicaciones clínicas para el paciente.

Los principales cambios que se evidencian en las células cancerosas con respecto a las normales están asociados a dos importantes procesos de regulación del crecimiento celular: la división celular y la apoptosis. Normalmente, las células crecen y se dividen según requerimiento del organismo, produciendo células nuevas que son esenciales para su correcto

funcionamiento. Asimismo, como parte del funcionamiento normal del organismo, las células mueren de forma programada cuando es necesario. Este proceso, conocido como apoptosis, ocurre cuando “algo va mal” en una célula. Por ejemplo, cuando las células de la piel son dañadas por la radiación ultravioleta (como cuando se forman las “escamas de bronceado” ante una exposición muy intensa a la radiación solar), normalmente se desencadena la apoptosis. Esto ayuda a eliminar cualquier célula fuertemente dañada que, de prevalecer, podría dividirse y transmitir sus modificaciones genéticas a las nuevas células formadas.

Tanto la división celular controlada como la apoptosis se ven alteradas en las células cancerosas: nuevas células se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita y otras viejas no mueren cuando deberían hacerlo. La división celular descontrolada da lugar a la formación de un tumor (agrandamiento anormal de una masa de tejido), que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos no se diseminan en otras partes del cuerpo, y generalmente se pueden extirpar sin generar futuras complicaciones al paciente. Los tumores malignos, en cambio, crecen sin control y sus células pueden circular por el torrente sanguíneo (arterias, vasos capilares y venas) y/o los vasos linfáticos (que transportan linfa y algunos glóbulos blancos a todos los tejidos del cuerpo) y diseminarse en otros órganos en un proceso conocido como metástasis. Para que una célula cancerosa migre hacia otra parte del cuerpo, debe ser capaz de sobrevivir en la sangre o en el sistema linfático e invadir un tejido extraño. Normalmente, la apoptosis podría prevenir estos hechos, ya que las células típicamente se “autodestruyen” cuando no están en contacto con otras células o con la matriz extracelular. El hecho de que las células cancerosas presentes en los tumores malignos sean capaces de evadir la apoptosis hace posible la metástasis, lo que conlleva a la formación de nuevos tumores en diferentes partes del organismo [2].

### A.1.3. Incidencia del cáncer en Argentina

Según datos provenientes de un estudio realizado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), en el año 2012 la incidencia del cáncer en Argentina se encontraba en el rango medio-alto, con 217 casos nuevos por cada 100.000 habitantes. Del total de casos estimados, el mayor porcentaje corresponde al cáncer de mama (17 % del total y 36 % en mujeres), como puede observarse en la Tabla A.1.1. Debido a su alta incidencia, se decidió utilizar el cáncer de mama como base de estudio para los experimentos involucrados en esta tesis, los cuales fueron realizados sobre líneas celulares normales y cancerosas de glándula mamaria de ratón (ver Sección B.1.2).

**Tabla A.1.1:** Distribución absoluta y relativa de casos incidentes de cáncer estimados en Argentina en el año 2012, según localizaciones tumorales más frecuentes.

Sitio tumoral	Promedio anual de casos	%
Mama	19.386	16,8
Colon-recto	13.558	11,8
Pulmón	11.244	9,8
Próstata	11.202	9,7
Cérvix	4.956	4,3
Riñón	4.068	3,5
Páncreas	3.988	3,5
Estómago	3.738	3,2
Vejiga	3.546	3,1
Linfoma No-Hodgkin	3.039	2,6
Leucemias	2.372	2,1
Ovario	2.274	2,0
Esófago	2.263	2,0
Otros	29.528	25,6
TOTAL	115.162	100,0

*Fuente: Sistema de Vigilancia Epidemiológica y Reporte del Cáncer  
Instituto Nacional del Cáncer, Argentina, 2016.*

## A.1.4. Diagnóstico de cáncer

El diagnóstico de cáncer es un proceso mediante el cual se efectúa una serie de pruebas sobre un paciente con el objeto de confirmar si padece o no la enfermedad [2]. Esto significa que el diagnóstico se realiza únicamente cuando el médico ha obtenido información que indique la posibilidad de padecimiento de cáncer. Antes de que sea necesario realizar un diagnóstico, es una práctica habitual el chequeo pre-sintomático (es decir, antes de que aparezcan los síntomas) de diferentes partes del cuerpo. La estrategia médica que se aplica en este caso se conoce como cribado o *screening*, y consiste en una medida preventiva que busca identificar la enfermedad de manera temprana dentro de una comunidad [2]. Este tipo de pruebas permite detectar tejidos cancerosos en la etapa inicial de su desarrollo, incrementando la posibilidad de realizar un tratamiento efectivo de la enfermedad<sup>1</sup>. Cuando se detecta alguna anomalía durante un estudio de este tipo, o bien cuando se presentan síntomas que sugieran la posibilidad de padecimiento de cáncer, el médico inicia el proceso

<sup>1</sup>Una interesante revisión de las técnicas de *screening* puede encontrarse en [3]. Además, en [4] se presenta un análisis del impacto de los resultados falsos negativos en programas de *screening*.



de diagnóstico mediante la investigación del historial personal y familiar del paciente y un análisis físico del mismo. Luego, dependiendo de la ubicación del tejido sospechoso y de las características del paciente, se recurre a la realización de alguno o varios de los siguientes estudios de diagnóstico [2, 5]:

1. Ensayos de laboratorio, entre los que se incluyen análisis de muestras de sangre y otros fluidos corporales. Niveles elevados o bajos de ciertos parámetros (con respecto a valores medios establecidos en la literatura médica) pueden representar signos de cáncer.
2. Análisis por imágenes, de los cuales los más utilizados en el diagnóstico de cáncer son la tomografía axial computarizada (CT), que brinda información anatómica, y su combinación con la tomografía de emisión de positrones (PET - CT), la cual brinda información funcional.
3. Biopsias: son procedimientos invasivos en los que el médico cirujano extrae una muestra de tejido del paciente, la cual es enviada posteriormente a un médico patólogo para su examinación microscópica.

Muchos de los estudios mencionados (principalmente los ensayos de laboratorio) dan como resultado un valor numérico correspondiente a un parámetro biológico (por ejemplo: concentración de inmunoglobulina, concentración de un marcador tumoral específico, etc.). Dichos parámetros se conocen como indicadores, y su comparación con valores “normales” (obtenidos mediante investigaciones médicas en un gran número de pacientes, clasificados según edad, sexo, peso, etc.) permite a los profesionales de la salud acotar el conjunto de posibles causas de los síntomas observados. Esto convierte a los indicadores en herramientas fundamentales para el diagnóstico de cualquier enfermedad y, en particular, del cáncer. Sin embargo, los médicos no pueden basarse exclusivamente en ellos para lograr un diagnóstico definitivo, sino que combinan los resultados provenientes de todos los estudios que se realizan sobre el paciente.

En el caso particular del cáncer de mama, las técnicas de diagnóstico por imágenes más comunes son la mamografía<sup>2</sup> (radiografía de mama), la ecografía (imagen del tejido a partir de ondas acústicas) y la resonancia magnética (MRI). No obstante, el diagnóstico definitivo del cáncer de mama sólo es posible mediante el examen microscópico de una muestra de tejido mamario sospechoso, es decir, de una biopsia de mama.

La confiabilidad de una técnica de diagnóstico está determinada principalmente por su sensibilidad (probabilidad de que el resultado del estudio sea positivo para una persona que padece la enfermedad) y especificidad (probabilidad de que un resultado sea negativo para un paciente que no padece la enfermedad y positivo para uno que sí la padece). Estas dos

---

<sup>2</sup>Esta técnica, si bien aún se utiliza con frecuencia, está empezando a dejarse de lado debido a que se han publicado estudios cuestionando su utilidad [6].

medidas de confiabilidad se combinan en las denominadas tasas de falsos positivos y falsos negativos [2]. Un falso positivo ocurre cuando un resultado se reporta como positivo y en realidad debería ser negativo, y un falso negativo ocurre cuando se reporta un resultado como negativo y en realidad debería ser positivo. De estos dos tipos de error en el diagnóstico, el falso negativo trae consecuencias más graves en el tratamiento del paciente, y por lo tanto es de suma importancia que esta medida sea lo más baja posible. Por ejemplo, en una investigación previa que involucró un total de 70 pacientes, el diagnóstico de cáncer de pulmón basado en broncoscopia presentó 18,2 % de falsos positivos y 16,2 % de falsos negativos, mientras que el mismo diagnóstico realizado mediante tomografía computarizada dio como resultado 36,4 % de falsos positivos y 18,9 % de falsos negativos [7]. Los estudios de tipo *screening* también son evaluados mediante estas medidas de confiabilidad. Por ejemplo, un amplio estudio de *screening* de cáncer de mama por medio de la técnica de mamografía digital llevado a cabo en 405.191 mujeres dio como resultado 9,4 % de falsos positivos y 0,11 % de falsos negativos [8].

## Capítulo A.2

# Espectroscopia de impedancia eléctrica celular

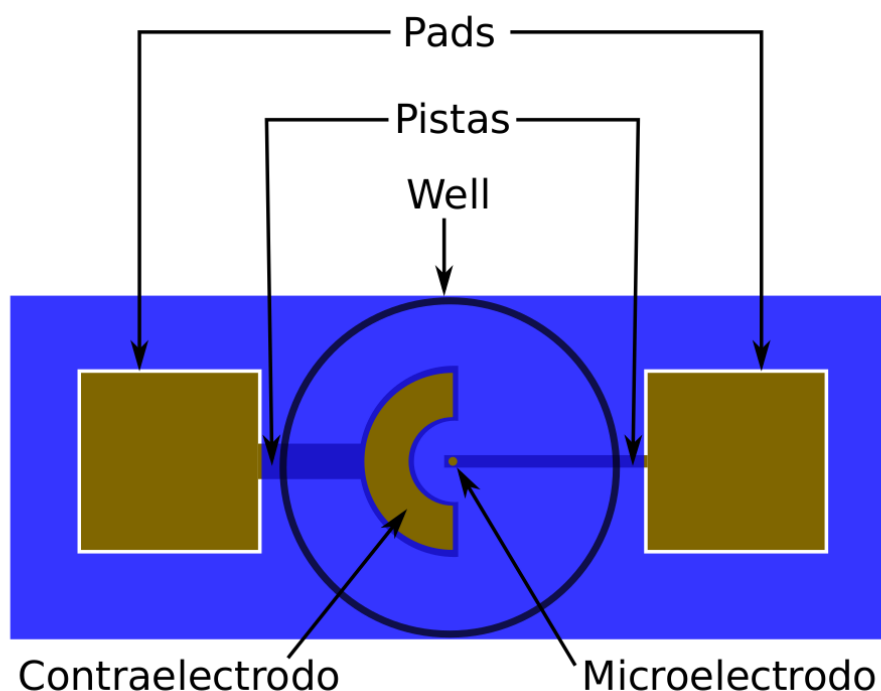
### A.2.1. Descripción de la técnica y aplicaciones

La impedancia eléctrica es una magnitud física que representa la oposición de un circuito al paso de corriente cuando se aplica sobre éste una diferencia de potencial eléctrico. La técnica conocida como Espectroscopia de Impedancia Eléctrica Celular (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*, ECIS) se enfoca en el estudio del comportamiento celular *in vitro*. La misma está basada en el monitoreo no invasivo<sup>1</sup> y en tiempo real de la impedancia eléctrica de un cultivo celular. Para medir dicha magnitud, se utilizan arreglos de microelectrodos (MEAs, *Microelectrode Arrays*) sobre los cuales se cultivan las células (Figura A.2.1). Un MEA consiste típicamente en un sustrato biocompatible (es decir, que facilita la adhesión y proliferación de células en su superficie) sobre el cual se ubican uno o más recipientes de cultivo llamados *wells*. En el interior de cada *well* se encuentran uno o más microelectrodos activos (a los cuales nos referiremos simplemente como microelectrodos) y un contraelectrodo de mucho mayor tamaño (generalmente, el área del contraelectrodo es como mínimo 30 veces mayor que la del microelectrodo). Estos electrodos se forman por deposición, a través de técnicas de microfabricación, de una capa de material conductor (también biocompatible), que generalmente es oro (Au), sobre el sustrato (generalmente vidrio o policarbonato). Además de los electrodos involucrados en la medición, dicha capa metálica forma también las pistas y los sitios de conexión llamados *pads*. Una capa de material aislante recubre las pistas, dejando expuestas únicamente las partes de la capa metálica correspondientes a los electrodos y a los *pads*. Las células se cultivan en el interior del *well* y se mide la impedancia

---

<sup>1</sup>En general, se reconoce como no invasivo a todo procedimiento que no involucre instrumentos que dañen la piel o que penetren físicamente en el cuerpo. Ejemplos de estos procedimientos son las radiografías, las tomografías computarizadas, las resonancias magnéticas, los exámenes oftalmológicos estándares, etc. No obstante, para estudios realizados *in vitro* se requiere una muestra de tejido, la cual debe ser extraída del cuerpo. En este sentido, el término “no invasivo” se refiere a que la técnica ECIS no produce daño alguno sobre el tejido cultivado.

eléctrica entre cada microelectrodo y el contraelectrodo.



**Figura A.2.1:** Vista superior de un arreglo de microelectrodos estándar para mediciones ECIS, que posee un único microelectrodo activo. Las zonas color dorado representan las partes expuestas de la capa metálica, mientras que el resto de la superficie (color azul) está cubierto por una capa de material aislante.

Se ha demostrado que la presencia de células adheridas al microelectrodo modifica sustancialmente su impedancia, y esto ha dado lugar a múltiples aplicaciones de esta técnica en el estudio del comportamiento de cultivos celulares *in vitro*. En particular, ha sido aplicada extensamente para el estudio de la propagación y adhesión celulares [9–14], diferenciación celular [15], citotoxicidad [16], ensayos de herida y cicatrización [17–19], estudio del comportamiento de células cancerosas [20–22], evaluación de patologías [23, 24], etc.

Existe una empresa, llamada *Applied Biophysics*, que se encarga de producir y distribuir sistemas de medición ECIS. Entre sus productos se encuentran desde diferentes tipos de MEAs hasta sistemas completos que incluyen tanto los MEAs como los instrumentos de medición y software de control.

## A.2.2. Respuesta eléctrica de microelectrodos desnudos

A lo largo de esta tesis, el término “microelectrodo desnudo” se emplea para designar a un microelectrodo que se encuentra en contacto con medio de cultivo<sup>2</sup> pero libre de células. Todas las mediciones de microelectrodos desnudos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones controladas que se emplearon en la medición de microelectrodos cubiertos con células (ver Sección B.1.3.2).

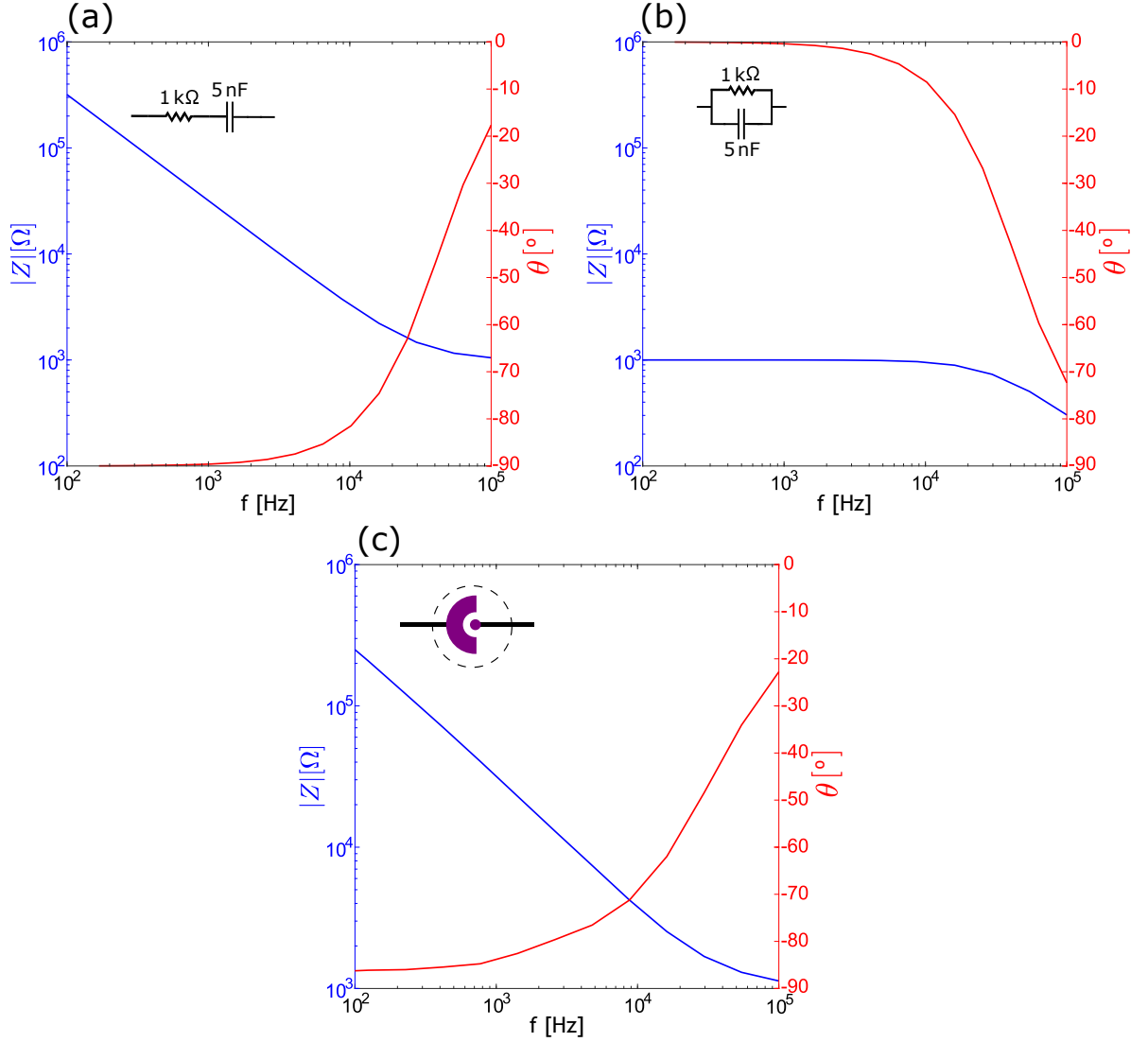
Al colocar un metal en contacto con una solución electrolítica, se genera inmediatamente un espacio de cargas en el electrolito sobre la interfase entre ambos [25]. Los valores medidos de impedancia en microelectrodos desnudos son el resultado de una serie de fenómenos que se llevan a cabo en esta región. Si bien la estructura de la interfase microelectrodo-electrolito es difícil de determinar, se han propuesto diferentes modelos que describen la capacidad eléctrica que se desarrolla en la misma, de los cuales los más importantes son el de Helmholtz, el de Gouy-Chapman y el de Stern. El modelo eléctrico completo de la interfase incluye, además de la capacidad eléctrica mencionada, una componente resistiva en paralelo con ésta. Detalles de todos estos modelos, así como un análisis de la dependencia de la respuesta eléctrica de microelectrodos desnudos con los diferentes parámetros de medición se pueden encontrar en los trabajos de Borkholder [25], Urdapilleta [14] y Bast [26].

Una de las ideas básicas de la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica, aplicada a un sistema biológico, es obtener información eléctrica que pueda traducirse, mediante la utilización de un modelo apropiado, en propiedades físicas específicas de dicho sistema. Para ello, es necesario describir el sistema como un circuito eléctrico equivalente, el cual debería contemplar (en un caso ideal) la contribución de todos sus elementos a la impedancia total. No obstante, un sistema biológico formado por un arreglo de microelectrodos en contacto con un medio de cultivo y células vivas es en general muy complejo e inhomogéneo tanto en su estructura como en su composición, haciendo difícil la tarea de seleccionar un circuito equivalente que represente adecuadamente su respuesta eléctrica. Esto hace necesario utilizar modelos simplificados que se adapten a la información que se desea extraer. En general, los modelos utilizados para extraer información de mediciones con la técnica ECIS consideran la impedancia total como un arreglo de un resistor y un capacitor en serie [10, 12, 13, 27, 28]. Debido a esta simplificación, los valores de resistencia y capacidad obtenidos varían con la frecuencia de excitación. En la Figura A.2.2 se muestran las respuestas en frecuencia de un circuito RC serie, un circuito RC paralelo y un circuito formado por un microelectrodo ECIS de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro en contacto con medio de cultivo. Las curvas correspondientes a los

---

<sup>2</sup>Se llama medio de cultivo a la solución electrolítica que contiene todos los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento de los cultivos celulares. Dicho medio, al poseer iones en solución, conduce la corriente eléctrica y posee una determinada resistividad eléctrica. Ver la sección B.1.3.1 para detalles sobre los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

circuitos RC son simulaciones realizadas con  $R = 1 \text{ k}\Omega$  y  $C = 5 \text{ nF}$ , mientras que las curvas del microelectrodo son mediciones experimentales. Como puede observarse, el sistema ECIS muestra una respuesta eléctrica de características muy similares al circuito equivalente RC serie. En todos los experimentos presentados en esta tesis, se modeló el sistema como un circuito RC serie.



**Figura A.2.2:** Respuestas en frecuencia de: (a) un circuito RC serie (simulación), (b) un circuito RC paralelo (simulación) y (c) un microelectrodo de Au de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro en contacto con medio de cultivo y libre de células (microelectrodo desnudo, datos experimentales).

Los valores de  $R$  y  $C$  en los circuitos simulados fueron  $1 \text{ k}\Omega$  y  $5 \text{ nF}$ , respectivamente.

En la Figura A.2.3 se muestran la resistencia y la capacidad equivalentes de un microelectrodo de oro de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro. Para cada frecuencia de la señal de excitación, se midió en primer lugar la impedancia compleja  $Z(f)$ , que se define como:

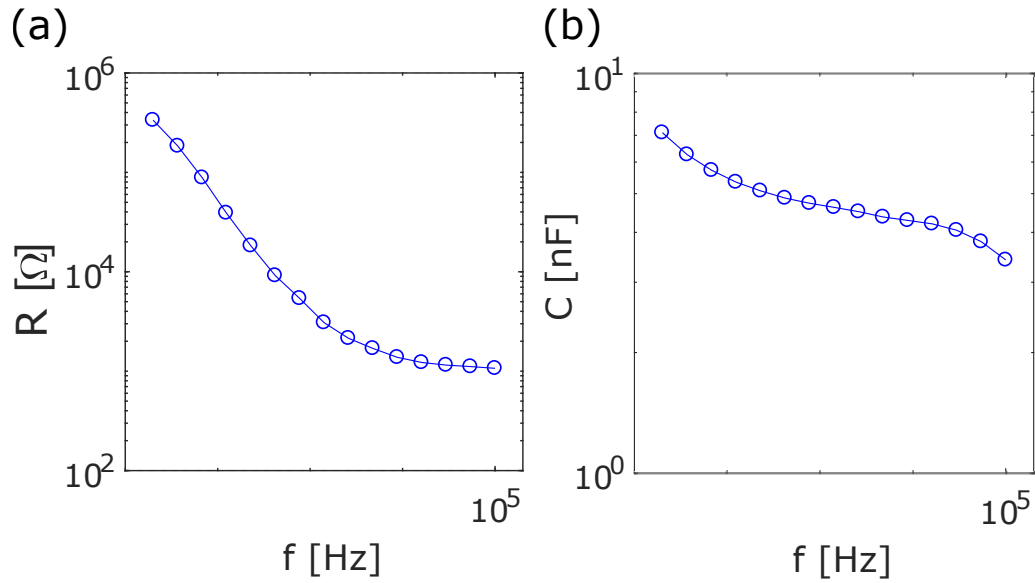
$$Z(f) = R(f) - \frac{j}{2\pi \cdot f \cdot C(f)}. \quad (\text{A.2.1})$$

En la ecuación (A.2.1),  $R$  representa la resistencia eléctrica,  $C$  la capacidad eléctrica,  $f$  la

frecuencia de la señal de excitación y  $j$  es la unidad imaginaria. Notar la dependencia explícita de  $R$  y  $C$  con la frecuencia. A partir de los valores medidos de  $Z(f)$  se calcularon los valores correspondientes de resistencia ( $R$ ) y capacidad ( $C$ ) equivalentes, según las ecuaciones:

$$R(f) = \Re \{Z(f)\}, \quad (\text{A.2.2a})$$

$$C(f) = -\frac{1}{2\pi \cdot f \cdot \Im \{Z(f)\}}. \quad (\text{A.2.2b})$$



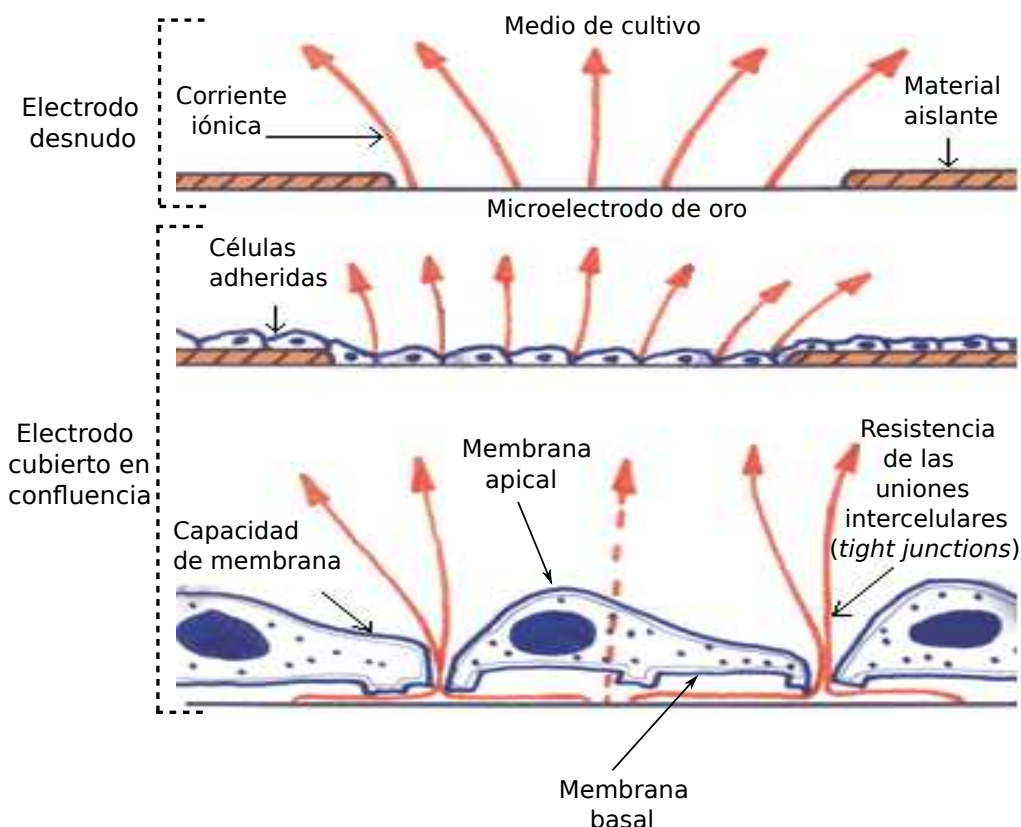
**Figura A.2.3:** Mediciones experimentales de la respuesta eléctrica de un microelectrodo desnudo de Au de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro. El sistema fue modelado como un circuito RC serie siguiendo las ecuaciones (A.2.2a) y (A.2.2b). La figura (a) muestra la resistencia eléctrica y la figura (b) la capacidad eléctrica, ambas en función de la frecuencia de excitación.

La respuesta eléctrica de un microelectrodo desnudo depende únicamente de sus detalles constructivos (material, forma y tamaño) y de la resistividad eléctrica del medio de cultivo. En todos los experimentos presentados en este trabajo se utilizaron medios de cultivo de resistividad eléctrica aproximadamente igual, por lo que las diferentes respuestas eléctricas que se presentan en los capítulos siguientes se deben únicamente a las diferencias constructivas de los MEAs. En la Sección C.1.5.1 se muestran resultados experimentales correspondientes a microelectrodos desnudos de diferentes materiales y tamaños.

### A.2.3. Respuesta eléctrica de microelectrodos cubiertos: modelo de Giaever y Keese

Cuando se realiza un cultivo celular sobre un arreglo de microelectrodos, en primer lugar las células se adhieren a la superficie disponible en el *well* y luego se multiplican, migran

y se extienden hasta cubrirla completamente. Durante el proceso de extensión, las células pasan de una forma cuasi esférica a una geometría más bien aplanada (Figura A.2.4), con la membrana basal ubicada cerca de la superficie del sustrato (que incluye tanto los electrodos como el material aislante). Las células utilizadas generalmente en experimentos ECIS se caracterizan por formar monocapas (no ocurre un apilamiento de células). Este tipo de células dejan de migrar y proliferar cuando ya no hay superficie libre disponible, lo que se conoce como inhibición por contacto. A partir de entonces, las mismas forman fuertes enlaces entre sí conocidos como *tight junctions*, dando una estructura mucho más firme a la monocapa. Este estado de máxima extensión y unión intercelular se conoce como confluencia. Alcanzado dicho estado, sólo se producen fluctuaciones de pequeña escala y corta duración que se deben a un fenómeno conocido como *micromotion* (micromovimiento), el cual se describe en la Sección A.2.4.

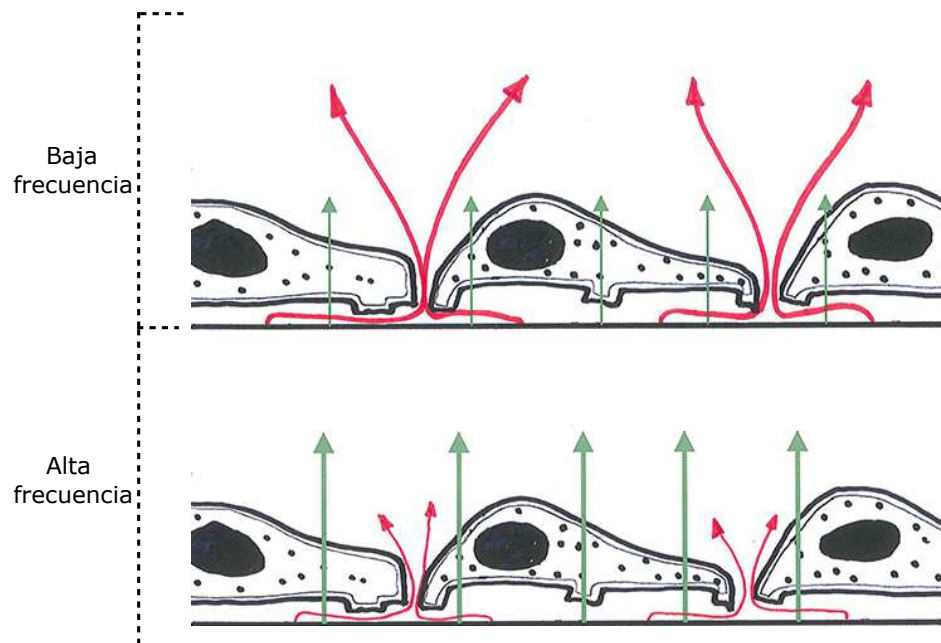


**Figura A.2.4:** Fundamentos de la técnica ECIS. La presencia de células sobre el microelectrodo dificulta el paso de la corriente eléctrica debido principalmente a su membrana celular (que actúa como un capacitor) y a la formación de los *tight junctions*. El efecto resultante es un aumento de la impedancia eléctrica del sistema, el cual puede modelarse como un circuito RC serie. (Basado en la descripción de la teoría ECIS dada en <http://www.biophysics.com/ecis-theory.php>).

Debido a que la impedancia compleja tiene una dependencia funcional con la frecuencia de excitación, la sensibilidad de la medición a la presencia de células sobre el microelectrodo también depende de la frecuencia, como se esquematiza en la Figura A.2.5. La corriente eléctrica que sale de la superficie del microelectrodo y se encuentra con una monocapa ce-



lular confluyente puede circular hacia el contraelectrodo por diferentes caminos: atravesando las células, por el espacio comprendido entre el microelectrodo y las membranas basales o a través de las uniones intercelulares. Estos diferentes caminos actúan como componentes eléctricos en paralelo, y la impedancia de cada uno depende de la frecuencia de la señal <sup>3</sup>. Dada la naturaleza predominantemente capacitiva de las células, a bajas frecuencias (menores a 100 Hz) la impedancia de éstas es mucho mayor que las restantes, y las líneas de corriente pasan principalmente por los espacios intercelulares y por el espacio comprendido entre el microelectrodo y las membranas basales, como se muestra en la parte superior de la Fig. A.2.5. Por lo tanto, los valores de impedancia medidos a bajas frecuencias son aproximadamente iguales a los correspondientes a los microelectrodos desnudos (las líneas de corriente “esquivan” a las células). En cambio, cuando la frecuencia es suficientemente elevada (superior a 100 kHz), la impedancia de las células es muy baja y la corriente fluye principalmente a través de ellas: en este caso, la capacidad medida se corresponde aproximadamente con la capacidad de las células, mientras que la resistencia medida se acerca al valor asintótico  $R_{f \rightarrow \infty}$  del microelectrodo desnudo. Este valor asintótico de resistencia a altas frecuencias se denomina resistencia de constricción, y depende únicamente de las características constructivas del microelectrodo y de la conductividad eléctrica de la solución electrolítica.



**Figura A.2.5:** Efecto de la frecuencia de medición sobre la impedancia del sistema. A bajas frecuencias, la impedancia es principalmente resistiva, y la mayor parte de la corriente circula por debajo de las células y por los espacios intercelulares (flechas rojas). A altas frecuencias, en cambio, la impedancia es principalmente capacitiva y la mayor parte de la corriente circula a través de las células (flechas verdes). (Basado en la descripción de la teoría ECIS dada en <http://www.biophysics.com/ecis-theory.php>).

<sup>3</sup>No se deben confundir estos componentes con la resistencia y la capacidad equivalentes del modelo RC serie que se emplea para describir el comportamiento global del sistema.

En la parte intermedia del espectro (entre 100 Hz y 100 kHz), la corriente se reparte entre los diferentes caminos y la respuesta eléctrica del microelectrodo cubierto varía según se observa en la Figura A.2.6. La normalización de las curvas de resistencia y capacidad (Figuras A.2.6(c) y A.2.6(d)) se realizó dividiendo los valores correspondientes a los microelectrodos cubiertos por los correspondientes a los microelectrodos desnudos, con el objeto de visualizar las diferencias entre ambos con mayor claridad. En efecto, la normalización de la curva de resistencia permite apreciar a simple vista la magnitud del cambio producido por la presencia de la monocapa celular sobre el microelectrodo, y además permite visualizar cuál es la frecuencia de excitación a la cual la sensibilidad es mayor (donde se encuentra el pico de resistencia normalizada). En general, la máxima sensibilidad en la señal de resistencia se observa a frecuencias comprendidas entre 1 y 20 kHz. En la gran mayoría de los trabajos que involucran la técnica ECIS se realiza este tipo de normalización para la presentación de los datos. Todas estas características de la respuesta eléctrica de microelectrodos cubiertos con células en estado de confluencia juegan un papel importante en la técnica de discriminación desarrollada en este trabajo, como se explica detalladamente en la Sección B.3.4.2.

Se han propuesto diversos modelos teóricos que relacionan la impedancia de electrodos cubiertos con una monocapa celular confluyente y ciertas propiedades biológicas del cultivo. De estos modelos, el primero y más conocido es el de Giaever y Keese [27], el cual posee tres parámetros, a saber:

1. La distancia entre la superficie del microelectrodo y la membrana basal de las células,  $h$ .
2. La resistencia eléctrica de los *tight junctions*,  $R_b$ .
3. La capacidad eléctrica equivalente de las membranas basal y apical<sup>4</sup> (consideradas en serie),  $C_m$ .

---

<sup>4</sup>Se llama membrana basal a la porción de membrana celular que se encuentra en contacto con el sustrato, mientras que la membrana apical se encuentra ubicada en la parte opuesta, en contacto con el medio de cultivo (ver Figura A.2.4)

Las ecuaciones asociadas al modelo de Giaever y Keese (abreviado “modelo GK”) son:

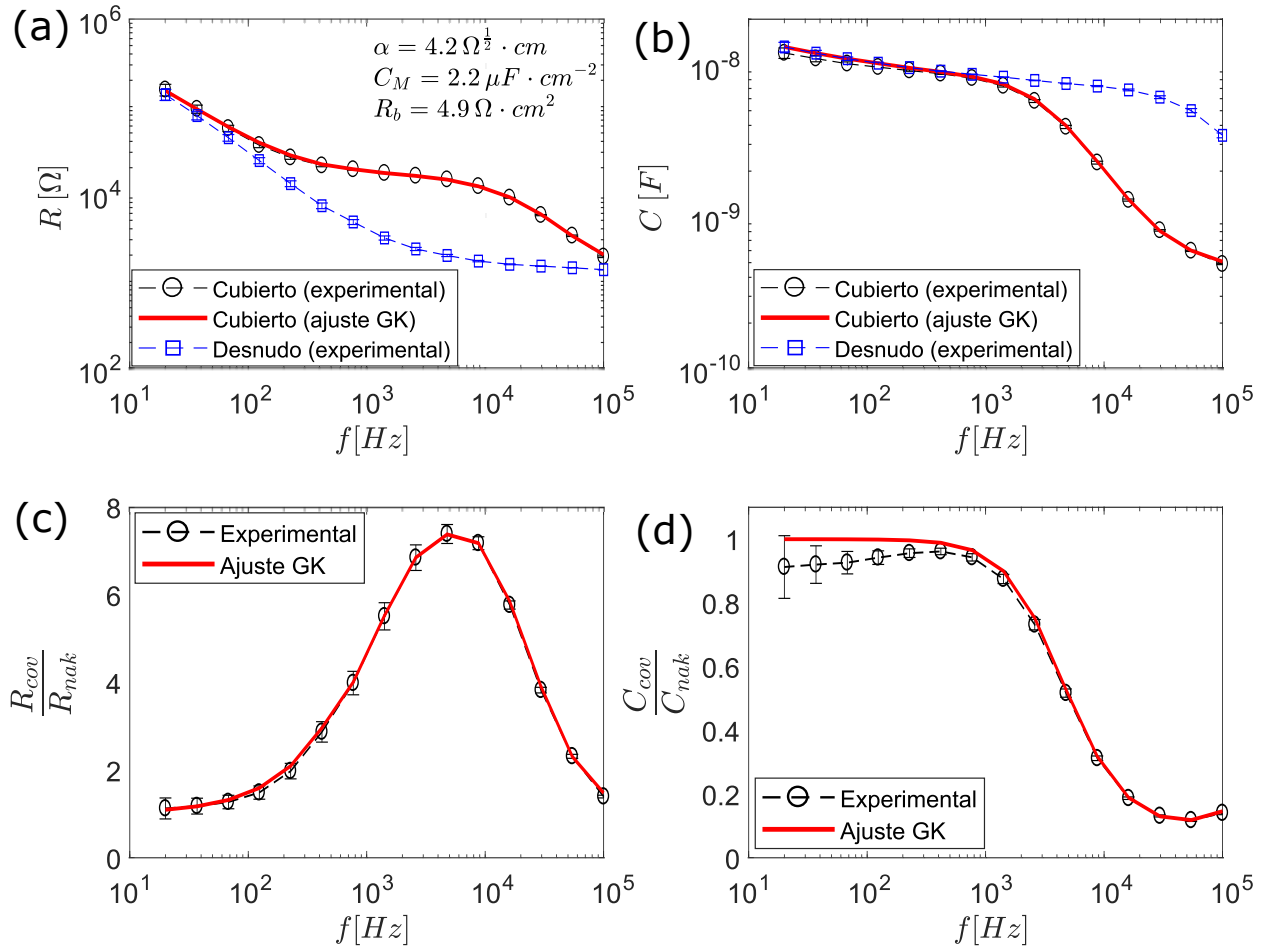
$$\frac{1}{Z_{cov}(f)} = \frac{1}{Z_{nak}(f)} \cdot \left[ \frac{Z_{nak}(f)}{Z_{nak}(f) + Z_m(f)} + \frac{\frac{Z_m(f)}{Z_{nak}(f) + Z_m(f)}}{\frac{\gamma \cdot r_c}{2} \cdot \frac{I_0(\gamma \cdot r_c)}{I_1(\gamma \cdot r_c)} + R_b \cdot \left[ \frac{1}{Z_{nak}(f)} + \frac{1}{Z_m(f)} \right]} \right], \quad (\text{A.2.3a})$$

$$\alpha = \frac{\gamma \cdot r_c}{\sqrt{\frac{1}{Z_{nak}(f)} + \frac{1}{Z_m(f)}}}, \quad (\text{A.2.3b})$$

$$C_m = \frac{-j}{\pi f Z_m(f)}, \quad (\text{A.2.3c})$$

donde  $Z_{cov}$  representa la impedancia compleja específica del microelectrodo (es decir, dividida por su área) cubierto con una monocapa celular confluyente,  $Z_{nak}$  es la impedancia compleja específica del microelectrodo desnudo,  $R_b$  es la resistencia específica de los *tight junctions*,  $C_m$  es la capacidad eléctrica específica equivalente de la membrana celular,  $I_0$  e  $I_1$  son funciones de Bessel modificadas de primera especie de orden cero y uno, respectivamente,  $f$  es la frecuencia de medición y  $j$  es la unidad imaginaria. Además,  $\gamma = \sqrt{\rho/h}$ , donde  $\rho$  es la resistividad eléctrica del medio de cultivo,  $r_c$  es el radio de las células (consideradas como discos circulares) y  $h$  es la distancia entre la membrana basal de las células y la superficie del microelectrodo. A partir de la medición de  $Z_{nak}$  y  $Z_{cov}$  a diferentes frecuencias del espectro, puede realizarse una estimación de los parámetros  $\alpha$ ,  $R_b$  y  $C_m$ .

Además de este modelo, existen otros más complejos, como el de Lo [11] y el de campo medio [29]. Dichos modelos tienen en cuenta otros factores que afectan el paso de la corriente a través de las células y están basados en hipótesis más realistas que las del modelo GK [27]. No obstante, este último resulta adecuado para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con este trabajo, y se optó por implementarlo en todos los ajustes que se presentan a lo largo de esta tesis. Detalles acerca de la derivación del modelo GK pueden encontrarse en [14].

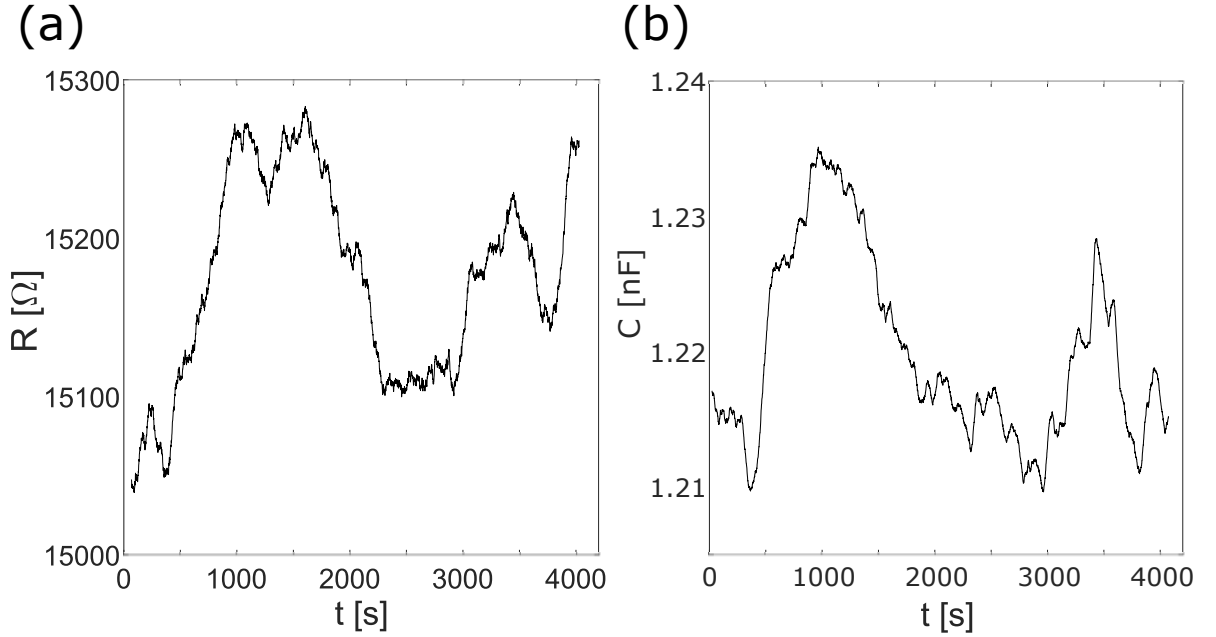


**Figura A.2.6:** Respuesta eléctrica de un microelectrodo de Au de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro cubierto con una monocapa confluyente de células LM3 (Sección B.1.2.4). La figura (a) muestra el espectro de resistencia equivalente del microelectrodo desnudo (cuadrados y línea cortada azules) y cubierto (círculos y línea cortada negros), junto con una curva (línea sólida roja) que representa el ajuste de los datos según el modelo GK (Ecuaciones (A.2.3)). En la misma figura se muestran los valores obtenidos de los tres parámetros del modelo. La figura (b) muestra el espectro de capacidad correspondiente, y las figuras (c) y (d) muestran los espectros de resistencia y capacidad normalizados, respectivamente. El subíndice *cov* representa al microelectrodo cubierto con células, mientras que el subíndice *nak* designa al microelectrodo desnudo.

## A.2.4. Micromovimiento

El *micromotion* (“micromovimiento”) es un fenómeno que se observa en mediciones de impedancia eléctrica de cultivos celulares confluentes y que consiste esencialmente en fluctuaciones de baja amplitud y corta duración en la señal medida. El mismo ha sido descrito por primera vez por Giaever y Keese [27]. Estos cambios son debidos principalmente a fluctuaciones locales en la distancia  $h$  entre la membrana basal de las células y el microelectrodo, así como en la fuerza de los *tight junctions* y en la geometría del espacio intercelular (correspondiente al área no ocupada por células). La Figura A.2.7 muestra un ejemplo de la variación temporal de la resistencia y la capacidad de un microelectrodo cubierto con una

capa de células en confluencia, donde se evidencia el fenómeno de micromovimiento.



**Figura A.2.7:** Micromovimiento celular durante el estado de confluencia. Se grafican la resistencia (a) y capacidad (b) equivalentes de un microelectrodo cubierto con una capa de células LM3 en dicho estado. Estas fluctuaciones se deben a que las células se estiran y desplazan distancias muy cortas (de ahí el nombre de *micromotion* o “micromovimiento”), generando pequeños cambios en los espacios por los cuales circula la corriente y modificando en consecuencia la impedancia del sistema.

El micromovimiento resulta de relevancia en el contexto de esta tesis debido a que se ha realizado un estudio detallado acerca de sus características en cultivos de células normales y cancerosas [21], encontrándose diferencias que podrían ser explotadas en el desarrollo de una técnica de discriminación entre ambos tipos celulares. Detalles de dicho estudio se presentan en la Sección A.2.6.

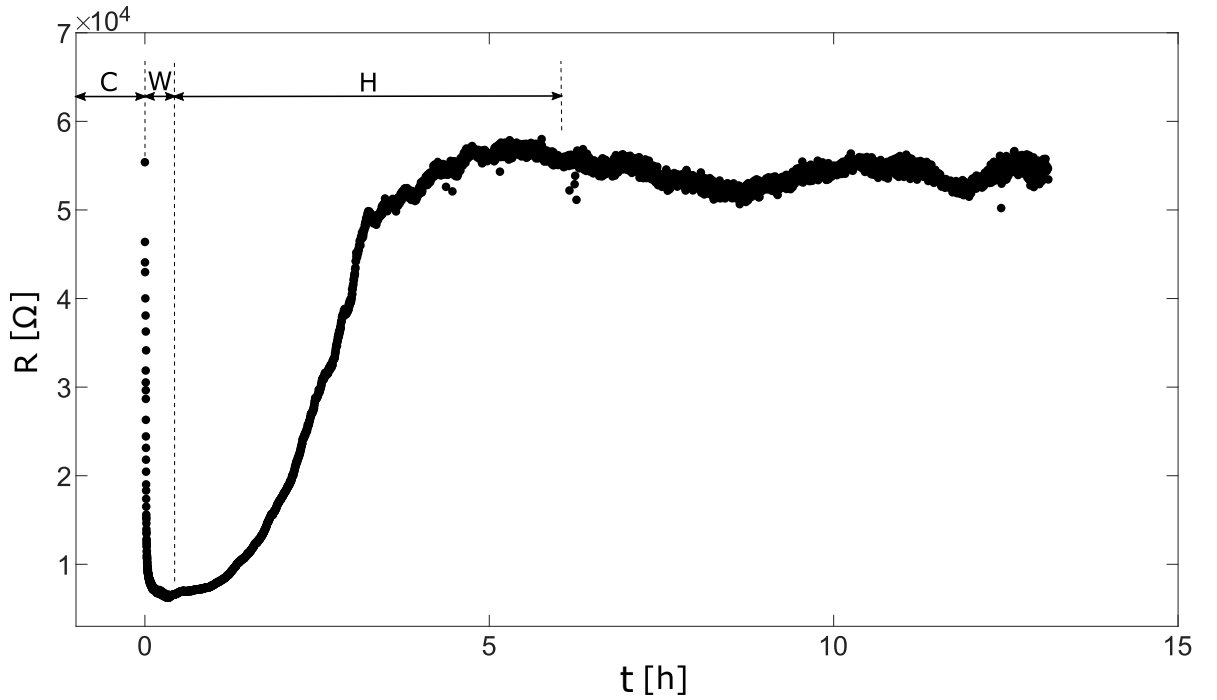
## A.2.5. Ensayos de herida y cicatrización

En el estudio de cultivos celulares *in vitro*, es posible efectuar un daño deliberado sobre una monocapa celular para llevar a cabo lo que se conoce como ensayo de herida y cicatrización (en inglés *wound-healing assay*, abreviado WH de aquí en adelante). Típicamente, un ensayo WH mecánico se lleva a cabo mediante la remoción física (por ejemplo, con la punta de una micropipeta) de una porción de monocapa celular, de modo tal de obtener una región libre de células sobre el sustrato. La superficie dañada, que ya no contiene células adheridas, queda entonces a disponibilidad de las células vivas que la rodean, las cuales, al no estar más inhibidas por contacto, tienden a reproducirse y migrar hasta recubrir completamente la zona herida en un proceso conocido como cicatrización. Este tipo de ensayo provee información sobre los mecanismos de migración y proliferación celular, los cuales participan de muchos

procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos. Numerosos ensayos similares han sido utilizados para estudiar la migración celular colectiva en diferentes procesos biológicos, tales como reparación tisular, embriogénesis y metástasis [30].

Una de las mayores limitaciones de un ensayo WH mecánico es la dificultad de definir el área exacta de la superficie dañada, dato que resulta de importancia para la cuantificación y reproducibilidad de los resultados en muchos estudios. Esta limitación fue superada, entre otras cosas, por el desarrollo de un ensayo de herida y cicatrización eléctrico [17] basado en la técnica ECIS. En este ensayo, una monocapa celular adherida a la superficie de un microelectrodo de oro es dañada mediante la inyección de una corriente eléctrica de relativamente alta amplitud y alta frecuencia, y posteriormente se registra la evolución temporal de la impedancia eléctrica durante la etapa de cicatrización. En contraste con el ensayo WH mecánico, mediante este método es posible determinar exactamente el área de la herida (definida por el área del microelectrodo) y también controlar la intensidad de la señal que se emplea para generarla. Dicha señal se conoce con el nombre de “señal de herida”.

La Figura A.2.8 muestra una medición típica de un ensayo WH eléctrico realizado según el esquema desarrollado y descrito en el Capítulo B.2. En ella se presenta la evolución temporal de la porción resistiva de la impedancia de un microelectrodo cubierto inicialmente con una monocapa confluyente de células MDCK-II (Sección B.1.2.1). En  $t = 0$ , el valor de resistencia corresponde a la monocapa celular confluyente. Inmediatamente luego de la primera medición, se empleó una señal de excitación de  $2 V_{\text{RMS}}$  a 64 kHz durante un tiempo efectivo de 10 min para generar la herida (este tipo de mediciones se explican con mayor detalle en el Capítulo B.2). La aplicación de esta señal da como resultado una rápida caída en la resistencia medida, la cual alcanza finalmente un valor mínimo asociado al microelectrodo libre de células. En las siguientes horas, se observa nuevamente un incremento en la resistencia hasta alcanzar un nivel correspondiente al electrodo cubierto con una monocapa celular confluyente. Este incremento se debe a la migración de las células ubicadas en el perímetro del microelectrodo hacia la superficie de éste, ocupando el espacio que dejaron disponible las células muertas.

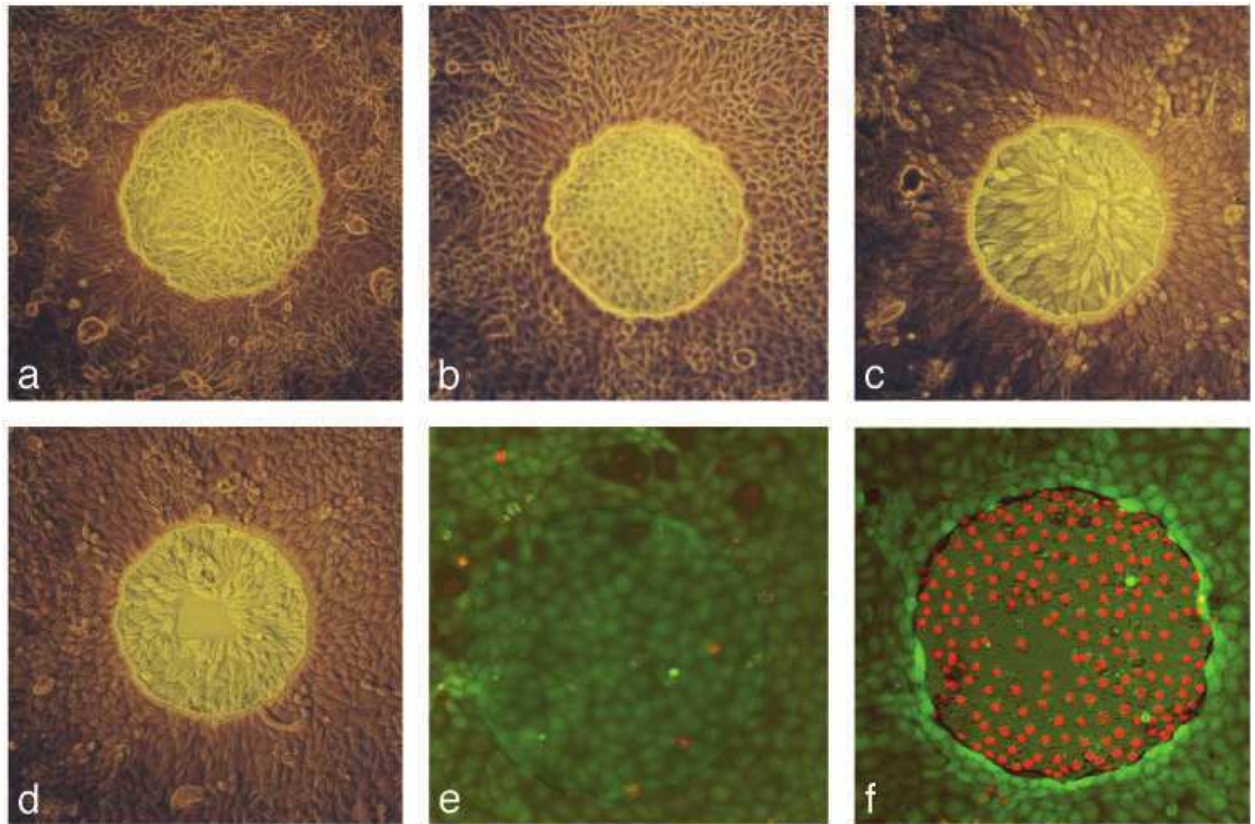


**Figura A.2.8:** Evolución temporal de la resistencia equivalente de un microelectrodo cubierto inicialmente con una monocapa confluyente de células MDCK durante un ensayo de herida y cicatrización eléctrico. Las flechas indican las diferentes etapas del ensayo: C (confluencia), W (herida) y H (cicatrización).

Para entender qué ocurre con las células heridas, Keese et al. [17] realizaron observaciones microscópicas de las mismas sobre el microelectrodo antes e inmediatamente después de generar la herida. A su vez, observaron las células muchas horas después para verificar que el proceso de cicatrización estaba completo. Los resultados de estos experimentos, extraídos de dicho trabajo, se presentan en la Figura A.2.9. La figura muestra micrografías obtenidas mediante un microscopio de contraste de fase en células MDCK-II (la misma línea celular utilizada en el experimento de la Figura A.2.8). La Figura A.2.9(a) muestra las células antes de la aplicación de la señal de herida. En la Figura A.2.9(b), que fue tomada inmediatamente después de la generación de la herida, se puede observar un cambio sutil en la apariencia de las células, las cuales muestran un menor contraste y fronteras intercelulares menos definidas. En este estado, a pesar de la presencia de estas estructuras celulares sobre el microelectrodo, las mediciones de impedancia dieron valores asociados al microelectrodo completamente libre de células. Los autores adjudicaron este fenómeno a que las células murieron debido a la corriente elevada, dando como resultado un ligero levantamiento de la capa celular sobre el microelectrodo o bien un daño severo de las membranas celulares. En ambos casos, la corriente podría circular libremente por debajo de las células muertas o a través de ellas, sin que se registre una impedancia detectable sobre el microelectrodo. Durante la cicatrización, las células vivas que migran hacia el microelectrodo pueden moverse por debajo de las células levantadas o bien desplazar las células muertas de modo similar al funcionamiento de un



vehículo quitanieves<sup>5</sup>.



**Figura A.2.9:** Micrografías de un cultivo celular antes y después de la herida, obtenidas por microscopía de contraste de fase. (a-d) Imágenes del microelectrodo con células MDCK antes de generar la herida (a), inmediatamente después de aplicar la señal de herida (b), y 20 horas luego de la herida (c y d). En (e) y (f) se muestran imágenes de coloración supravital de células NRK antes y después de la herida, respectivamente (ver texto para detalles). Extraído del trabajo de Keese et al. titulado “Electrical wound-healing assay for cells in vitro” [17].

Para verificar que las células ubicadas sobre el microelectrodo realmente murieron, dichos autores realizaron experimentos de coloración supravital<sup>6</sup> cuyos resultados se muestran en las Figuras A.2.9(e) y A.2.9(f) para células NRK<sup>7</sup> antes y después de aplicar la señal de herida, respectivamente. En el experimento, los autores emplearon dos colorantes diferentes: uno de ellos encargado de detectar la pérdida de la integridad en la membrana celular (colorante rojo en la figura) y otro que mide la viabilidad celular (colorante verde en la figura). Como puede observarse, los resultados de coloración supravital indican que la muerte celular se restringe a las células ubicadas sobre el microelectrodo, y esto coincide con la disminución de resistencia eléctrica observada en la Figura A.2.8. A lo largo de esta tesis, se asume la muerte celular en experimentos WH en base a los resultados descritos previamente, sin

<sup>5</sup>Esta analogía puede encontrarse explícitamente en el trabajo citado [17]: “[...] the migrating cells then either move beneath the lifted cell layer or displace the wounded cells in a snowplow-like fashion.”

<sup>6</sup>La coloración supravital es un proceso que consiste en teñir, mediante colorantes químicos, células o estructuras que han sido removidas de su contexto biológico (es decir, se realiza *in vitro*). Al provocar que éstas adquieran los colores de contraste, se puede estudiar su ubicación y morfología en un experimento.

<sup>7</sup>NRK: *Normal Rat Kidney Cells*, células normales de riñón de rata.

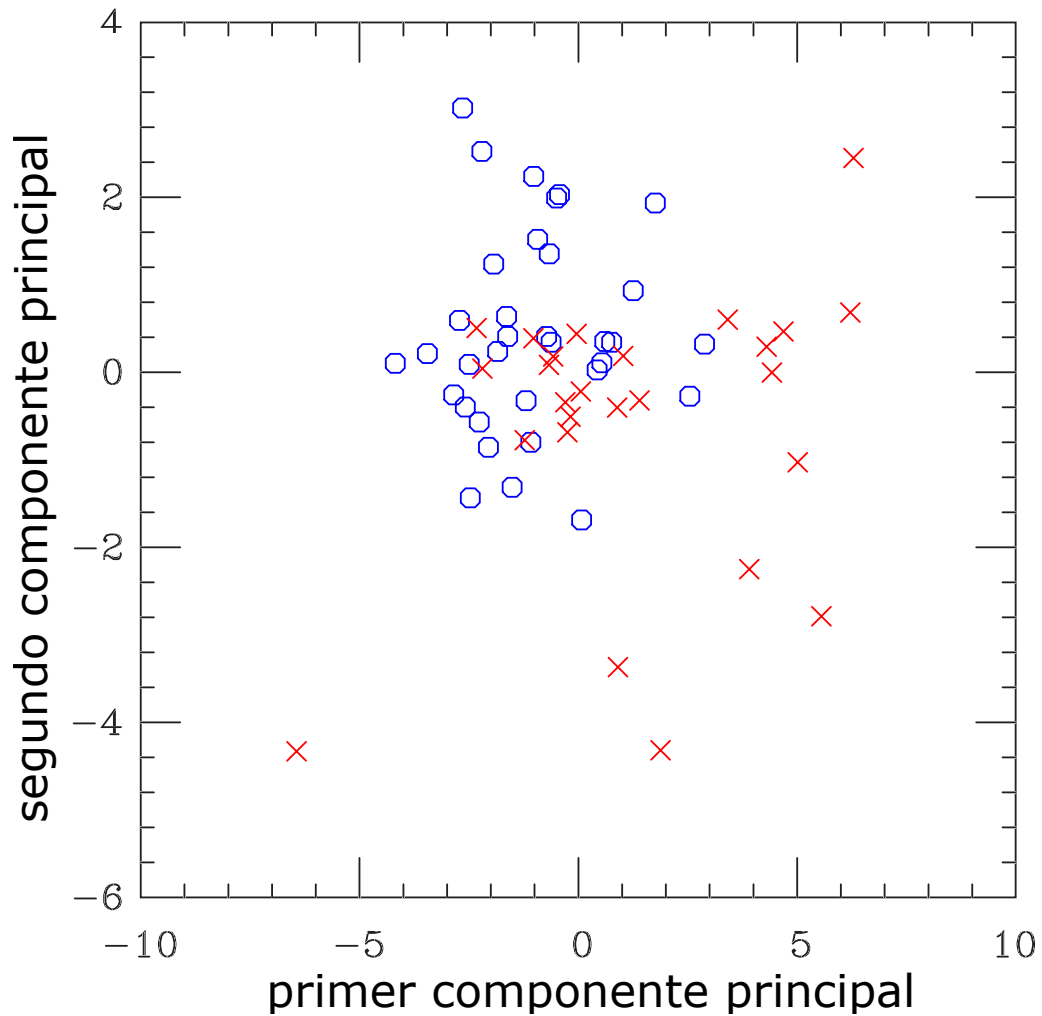


realizar una verificación mediante técnicas microscópicas.

## A.2.6. La técnica ECIS en el diagnóstico de cáncer

Como se describió en la Sección [A.1.4](#), la etapa final en el diagnóstico del cáncer de mama (y muchos otros tipos de cáncer) consiste en la observación microscópica de tejidos que se sospechan cancerosos. Investigaciones previas han demostrado que existen discrepancias entre las respuestas eléctricas de células normales y cancerosas analizadas mediante la técnica ECIS [[9](#), [10](#), [20](#), [21](#), [27](#), [31–33](#)]. Las mismas son causadas principalmente por diferencias a nivel morfológico y estructural, y esta información podría ser utilizada para generar un indicador que pueda ser empleado en el diagnóstico de cáncer.

Uno de los trabajos más importantes relacionados a la aplicación de la técnica ECIS para la discriminación entre células normales y cancerosas fue publicado por Lovelady et al. [[21](#)]. En dicho trabajo, los autores realizaron mediciones de impedancia eléctrica en cultivos de células epiteliales normales y cancerosas de ovario humano. Particularmente, analizaron la evolución temporal de las partes real e imaginaria de la impedancia eléctrica durante el *micromotion* (Sección [A.2.4](#)). Dicho análisis involucró la determinación de espectros de potencia y exponentes de Hurst, el análisis de fluctuaciones sin tendencia y la estimación de tiempos de correlación. A partir de las mediciones, extrajeron 14 parámetros característicos y calcularon sus valores medios y desvíos estándar para las poblaciones de células normales y cancerosas. Luego, realizaron una serie de *tests* estadísticos comparando las distribuciones de cada uno de estos parámetros para determinar su capacidad de discriminar entre ambos tipos celulares (estos *tests* se detallan en la Sección [B.3.5.1](#)). La Figura [A.2.10](#), extraída de dicho trabajo, muestra un análisis de componentes principales realizado sobre el espacio de 14 dimensiones definido por los parámetros característicos mencionados.



**Figura A.2.10:** Resultados del análisis del *micromotion* para la discriminación entre células normales y cancerosas. Se muestra la proyección del espacio 14-dimensional (ver texto) sobre los dos primeros componentes principales. Los círculos azules representan células normales y las cruces rojas células cancerosas. Extraído del trabajo de Lovelady et al. titulado “Distinguishing cancerous from noncancerous cells through analysis of electrical noise” [21].

Como puede observarse, la superposición de los *clusters* en la Fig. A.2.10 hace difícil distinguir mediciones individuales a partir de este análisis. No obstante, los autores reportaron que es posible distinguir ambos tipos celulares a partir de las señales de ruido (Figura A.2.7). Para ello, concatenaron en primer lugar todas las señales correspondientes a células normales para formar una distribución de referencia, y realizaron el mismo procedimiento para las células cancerosas. Luego, midieron la señal de *micromotion* en una muestra que no formaba parte de los conjuntos de referencia y aplicaron el *test* de Kolmogorov-Smirnov (Sección B.3.5.1) para determinar las probabilidades de que dicha muestra provenga de ambas distribuciones de referencia. Finalmente, clasificaron a la muestra como normal o cancerosa en función del mayor valor de probabilidad obtenido. En promedio, obtuvieron un 79,2% de identificaciones correctas. Los autores concluyeron que, si bien el método podría funcionar para discriminar células normales de cancerosas, no pretendía ser utilizado en el diagnóstico de cáncer sino como herramienta para la generación de una base de datos con características

de diferentes tipos celulares.

Además del trabajo de Lovelady et al., otros estudios fueron realizados en este contexto. Particularmente, han habido propuestas de diagnóstico de cáncer a partir de mediciones de impedancia *in vivo* [34, 35], pero los resultados, que involucraron el análisis únicamente de espectros de impedancia en condiciones estacionarias, fueron poco concluyentes y no se pudo lograr una separación correcta entre tumores y tejidos normales. Más recientemente, se ha propuesto un dispositivo de diagnóstico *in vivo* para detección de cáncer de piel [20] basado en un análisis de regresión lineal entre los módulos y las fases de las impedancias medidas en lesiones aparentes y en tejidos circundantes considerados sanos. Todos los trabajos mencionados se basaron en la comparación entre espectros de impedancia de tejidos o cultivos celulares normales y cancerosos en estado de confluencia. Sin embargo, aún no ha sido propuesta una metodología sistemática y unificada que permita clasificar una muestra desconocida como normal o cancerosa a partir de una combinación de resultados provenientes de diferentes etapas del desarrollo de monocapas celulares y ensayos de herida y cicatrización. Esto motivó la realización de este trabajo de investigación, cuyos objetivos se presentan a continuación.

## Capítulo A.3

# Objetivos de este trabajo

### A.3.1. Objetivo general

A partir de mediciones impedancia eléctrica de cultivos celulares *in vitro*, desarrollar una técnica que permita diferenciar células normales de cancerosas y obtener indicadores estadísticos que contribuyan en el diagnóstico de cáncer.

### A.3.2. Objetivos específicos

- Analizar las propiedades eléctricas de cultivos celulares mediante diferentes experimentos y técnicas de medición basados en la técnica ECIS.
- Diseñar y construir arreglos de microelectrodos biocompatibles según los requerimientos de los experimentos propuestos. Ensayar diferentes materiales de fabricación y diferentes tamaños de microelectrodos.
- Elaborar un protocolo de trabajo que abarque todo el proceso de medición.
- Implementar el protocolo de medición desarrollado para analizar el comportamiento de células normales y cancerosas y encontrar parámetros característicos que permitan discriminarlas entre sí.
- A partir de los datos obtenidos experimentalmente, aplicar un análisis estadístico que contribuya a la discriminación entre ambos tipos celulares y a su vez permita evaluar el error cometido en términos de la proporción de falsos positivos y falsos negativos.
- Proponer indicadores de diagnóstico de cáncer basados en los resultados de los experimentos.

## Parte B

### Análisis de cultivos celulares individuales

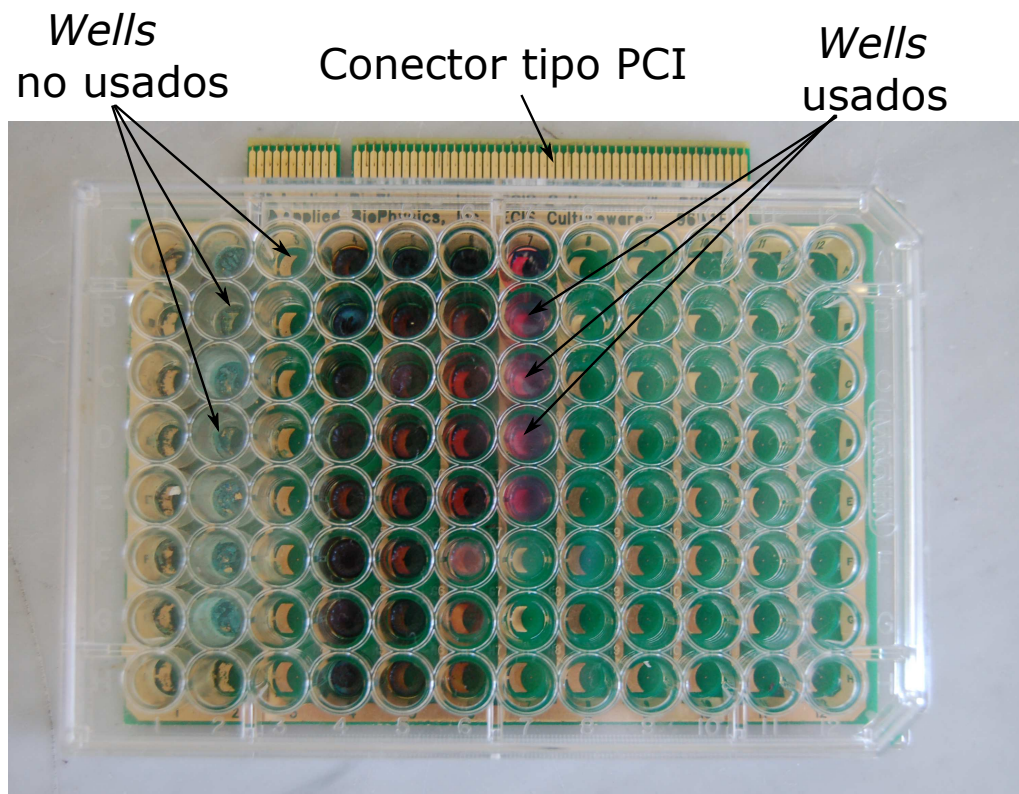
# Capítulo B.1

## Materiales y métodos experimentales

### B.1.1. Medición de impedancia eléctrica

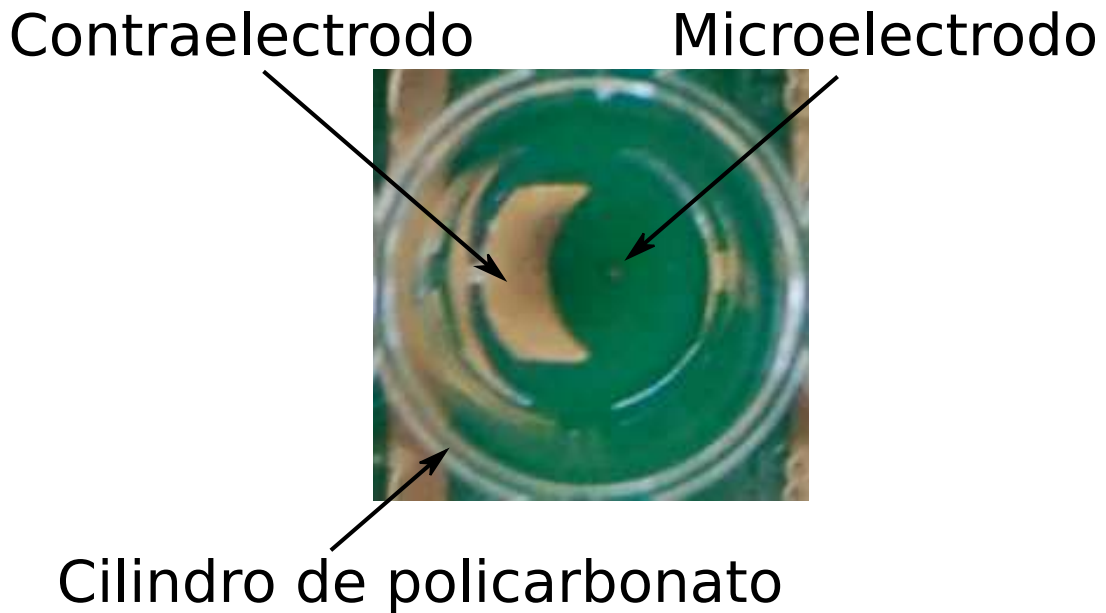
#### B.1.1.1. Arreglos de microelectrodos

Las mediciones reportadas en el Capítulo B.2 se realizaron utilizando un *multiwell* comercial (Applied BioPhysics, Troy, EEUU) al que denominamos MW1. El mismo consiste en un arreglo de 96 *wells* organizados en una matriz de 8 x 12, como se muestra en la Figura B.1.1.



**Figura B.1.1:** Fotografía del *multiwell* MW1 (vista superior). Se muestra el conector tipo PCI y se indican algunos *wells* sin usar y otros usados que contienen medio de cultivo (líquido color rosa).

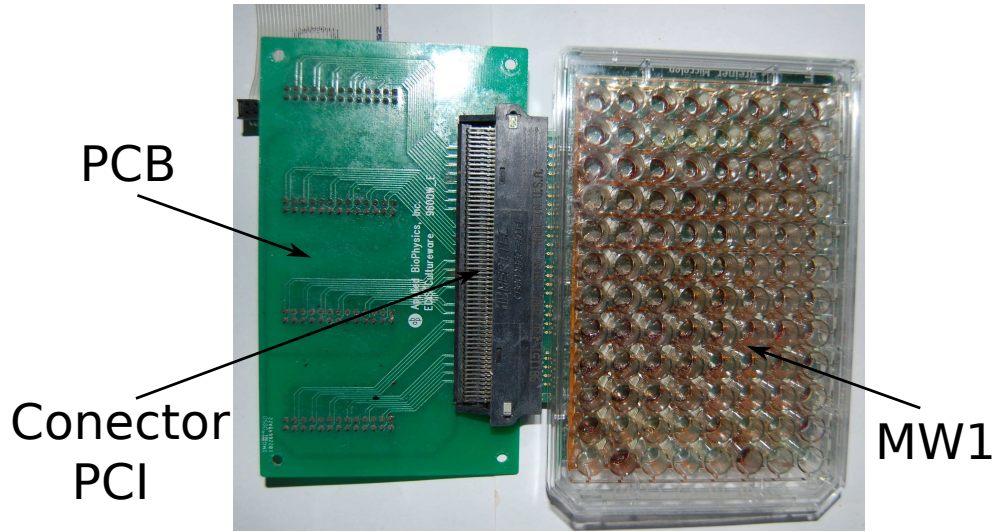
Cada *well* contiene un microelectrodo circular de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro ( $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  de área) y un contraelectrodo semianular de área aproximadamente 300 veces mayor, ambos de oro. Los electrodos se encuentran delimitados por un contenedor cilíndrico de policarbonato de 6.4 mm de diámetro interno, como se muestra en la Figura B.1.2.



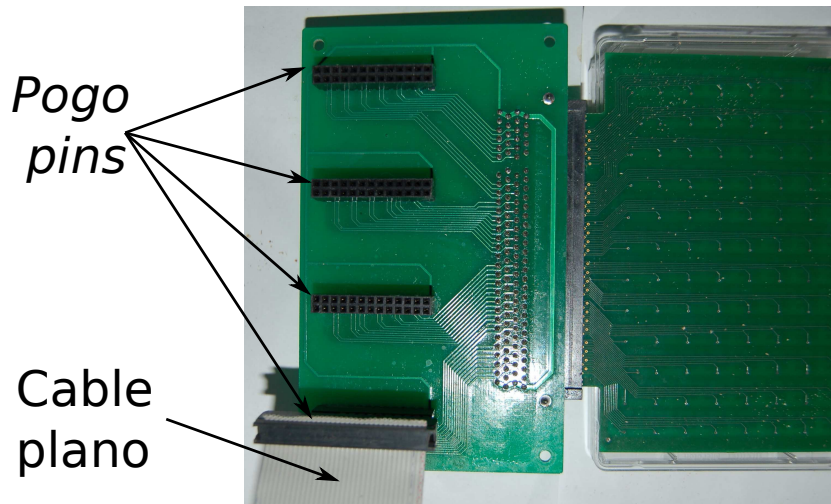
**Figura B.1.2:** Fotografía de un *well* contenido en el dispositivo MW1 (vista superior). Se indican los electrodos y el contenedor cilíndrico que delimita el área de cultivo.

El *multiwell* está montado sobre una placa de circuito impreso (PCB) que tiene diagramadas todas las pistas correspondientes a los diferentes microelectrodos y contraelectrodos (todos los contraelectrodos están interconectados, funcionando como tierra del circuito). Como puede verse en la Fig. B.1.1, la placa PCB tiene un conector de tipo PCI (*Peripheral Bus Interconnect*) macho, que permite su conexión a un soporte destinado a tal fin, el cual posee 4 salidas con formato de *pogo pins*. Para conectar los diferentes sistemas de medición con el *multiwell*, se construyó un conector empleando un cable plano soldado a un conjunto de 26 pines. La Figura B.1.3 muestra el sistema completo (dispositivo MW1 montado sobre el soporte y las conexiones respectivas).

(a)



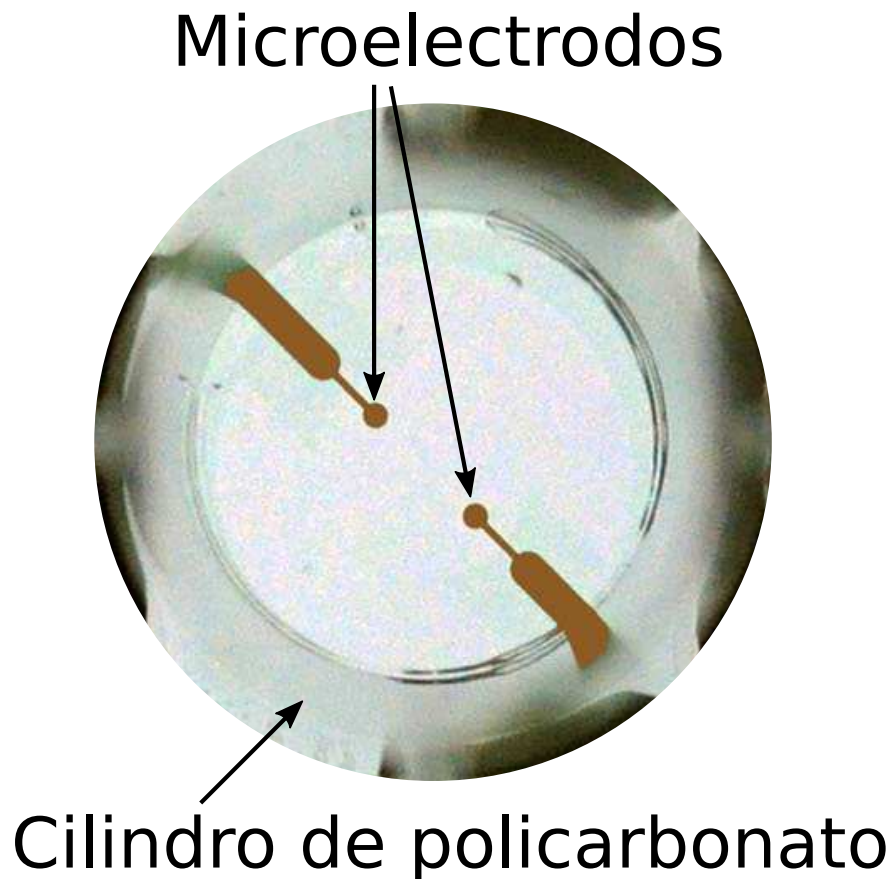
(b)



**Figura B.1.3:** Fotografía del dispositivo MW1 montado en su soporte. Se muestran las vistas superior (a) e inferior (b).

Además del MW1, se utilizó otro *multiwell* similar (96W1E+ PET, Applied BioPhysics, Troy, EEUU) al que denominaremos MW2 y que fue empleado en los experimentos del Capítulo B.3. A diferencia del MW1, este *multiwell* posee dos microelectrodos de igual diámetro en cada *well*, como se muestra en la Figura B.1.4. El diámetro de estos microelectrodos es tal que, en conjunto, su respuesta eléctrica es idéntica a la del MW1, y por lo tanto el área activa efectiva es también de  $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ . Al igual que en el MW1, el diámetro interno de cada *well* es de 6.4 mm.





**Figura B.1.4:** Fotografía de un *well* contenido en el dispositivo MW2 (vista superior). Se indican los microelectrodos y el contenedor cilíndrico que delimita el área de cultivo.

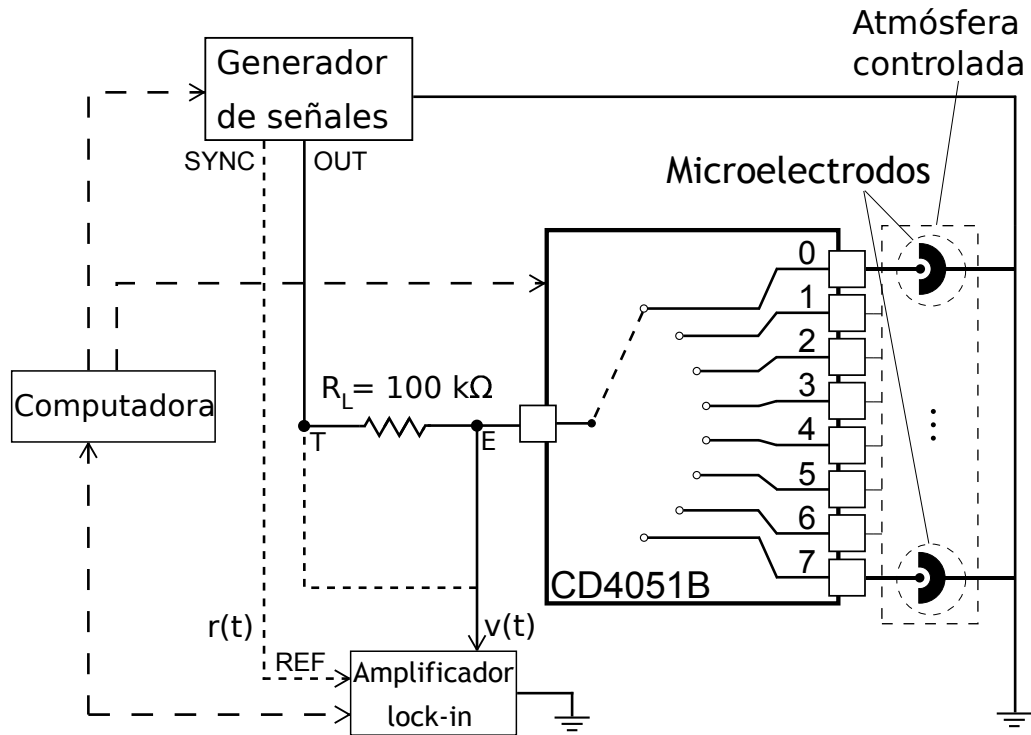
La conexión del MW2 es diferente a la del MW1. Los *wells* se encuentran montados sobre una PCB que posee sus terminales sobre la cara inferior (es decir, del lado opuesto al que contiene los *wells*), y los mismos se conectan a un arreglo de pines retráctiles que se encuentran integrados en un soporte con salidas de tipo *pogo pins* idénticas a las del MW1. Sin embargo, para que la conexión entre la PCB y los pines retráctiles sea fiable, se requiere un dispositivo adicional de tipo prensa que presiona ambas partes de manera uniforme, evitando que las vibraciones y movimientos leves (normales dentro de una incubadora y durante la manipulación de las células en el dispositivo) desconecten los electrodos. Al momento de utilizar este sistema, se poseía tanto el MW2 como el arreglo de pines retráctiles, pero no se contaba con el dispositivo de tipo prensa, el cual fue diseñado y construido a pedido del grupo de trabajo para la realización de esta investigación<sup>1</sup>.

#### B.1.1.2. Sistema de medición ECIS estándar

Uno de los dos sistemas de medición ECIS utilizados en esta tesis es una versión modificada del sistema originalmente publicado por Giaever y Keese [9], y se esquematiza en la

<sup>1</sup>Este dispositivo fue construido por el técnico Pablo Ballina, miembro del Taller Mecánico del Centro Atómico Bariloche.

Figura B.1.5. Un generador de señales (Hewlett-Packard, HP33120A) aplica una señal sinusoidal de  $100 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  al microelectrodo a través de una resistencia en serie de  $100 \text{ k}\Omega$ , con el objeto de producir corrientes no invasivas de amplitudes menores a  $1 \mu\text{A}$ . El instrumento utilizado para medir las caídas de potencial en fase y contrafase es un amplificador *lock-in* (Stanford Research Systems, SR530). Los diferentes microelectrodos activos se seleccionan por medio de un circuito selector de canales basado en el chip CD4051B (Texas Instruments), cuyas características de *performance* AC son adecuadas para las mediciones realizadas en este trabajo (ver Apéndice V). Este circuito fue diseñado, construido e implementado como parte del trabajo desarrollado en esta tesis, y significó una gran mejora en la capacidad de medición, permitiendo automatizar la toma de datos de forma secuencial y haciendo posible realizar experimentos de larga duración (mayor a la jornada laboral) en múltiples muestras de forma simultánea.



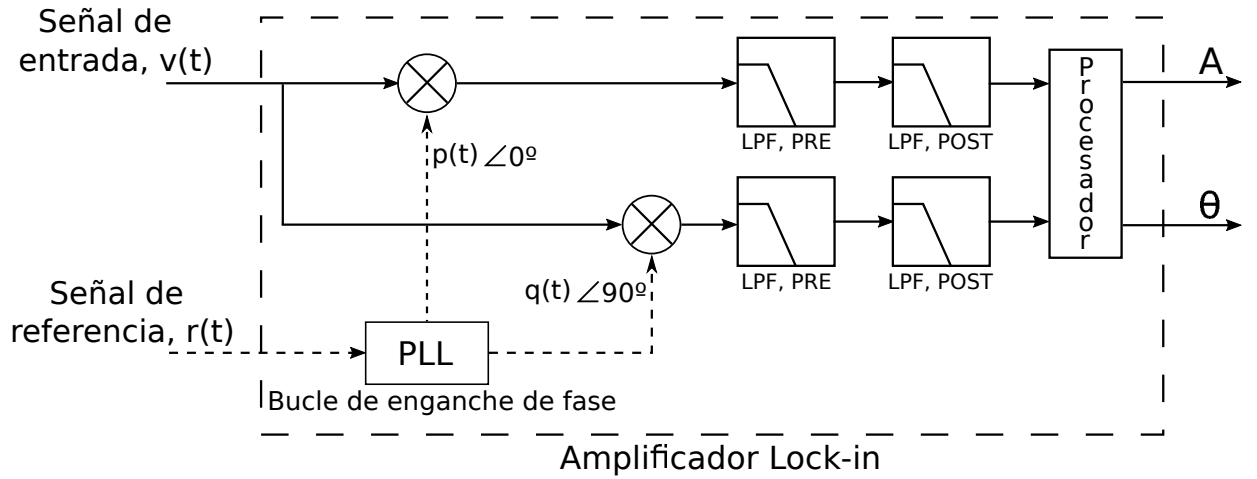
**Figura B.1.5:** Esquema estándar de medición de impedancia implementado en esta tesis, con el agregado de un circuito de selección de canales desarrollado como parte de este trabajo. El generador de señales aplica una señal sinusoidal de  $100 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  en los microelectrodos a través de una resistencia en serie de  $100 \text{ k}\Omega$ . El amplificador *lock-in* mide la magnitud y el ángulo de fase (con respecto a la referencia) de la caída de potencial a través de los microelectrodos, los cuales son modelados como circuitos equivalentes RC serie. La computadora controla los parámetros de la medición, selecciona el microelectrodo activo a través del circuito selector y procesa los datos.

La señal de sincronización  $r(t)$  sale del generador de señales y se conecta a la entrada de referencia del amplificador *lock-in* (LIA, *lock-in amplifier*), como se muestra en la Figura B.1.6. El LIA posee integrado un bucle de enganche de fase (PLL, *phase-locked loop*) que recibe la señal de referencia y genera las señales  $p(t)$  y  $q(t)$ , las cuales están en fase y en

cuadratura con  $r(t)$ , respectivamente. Estas dos señales se multiplican por la señal de entrada del LIA,  $v(t)$ , y las señales resultantes pasan cada una por dos filtros pasa-bajos en serie. Mediante un cálculo final, el LIA devuelve la magnitud de la señal de entrada,  $A$ , y su fase con respecto a la señal de referencia,  $\theta$ . Los parámetros más importantes de la medición son las constantes de tiempo de los filtros demoduladores (denominados PRE y POST) y la sensibilidad de entrada (escala).

Para determinar el valor de la impedancia de un microelectrodo, se miden en primer lugar los valores  $A_t$  y  $\theta_t$  correspondientes a la señal “total” que sale del generador de señales. Para ello, la señal  $v(t)$  (canal de entrada del *lock-in*) se toma directamente desde la salida del generador de señales (punto de conexión **T** en la Figura B.1.5, línea punteada). El voltaje total  $V_t$  viene dado por la ecuación:

$$V_t = A_t e^{j(2\pi ft + \theta_t)}. \quad (\text{B.1.1})$$



**Figura B.1.6:** Esquema de funcionamiento del amplificador *lock-in*. Las señales  $v(t)$  y  $r(t)$  se corresponden con las mismas de la Figura B.1.5. Los valores de salida  $A$  y  $\theta$  son la amplitud de la señal de entrada y su fase con respecto a la señal de referencia, respectivamente. LPF: *low-pass filter* (filtro pasabajos).

Luego, se determinan los valores  $A_e$  y  $\theta_e$  correspondientes a la caída de potencial sobre el microelectrodo, tomando la señal  $v(t)$  desde el punto **E** en la Figura B.1.5. El voltaje  $V_e$  se calcula con la Ecuación (B.1.1) reemplazando  $A_t$  por  $A_e$  y  $\theta_t$  por  $\theta_e$ . La corriente que circula a través del circuito es:

$$I = \frac{V_t - V_e}{R_L} = \frac{V_e}{Z_e}, \quad (\text{B.1.2})$$

donde  $R_L = 100 \text{ k}\Omega$ . Por lo tanto, la impedancia del microelectrodo  $Z_e$  se calcula mediante la siguiente expresión:

$$Z_e = R_L \frac{V_e}{V_t - V_e}, \quad (\text{B.1.3})$$

y, en términos de los valores de salida del *lock-in*:

$$Z_e = \frac{R_L}{\frac{A_t}{A_e} e^{j(\theta_t - \theta_e)} - 1}. \quad (\text{B.1.4})$$

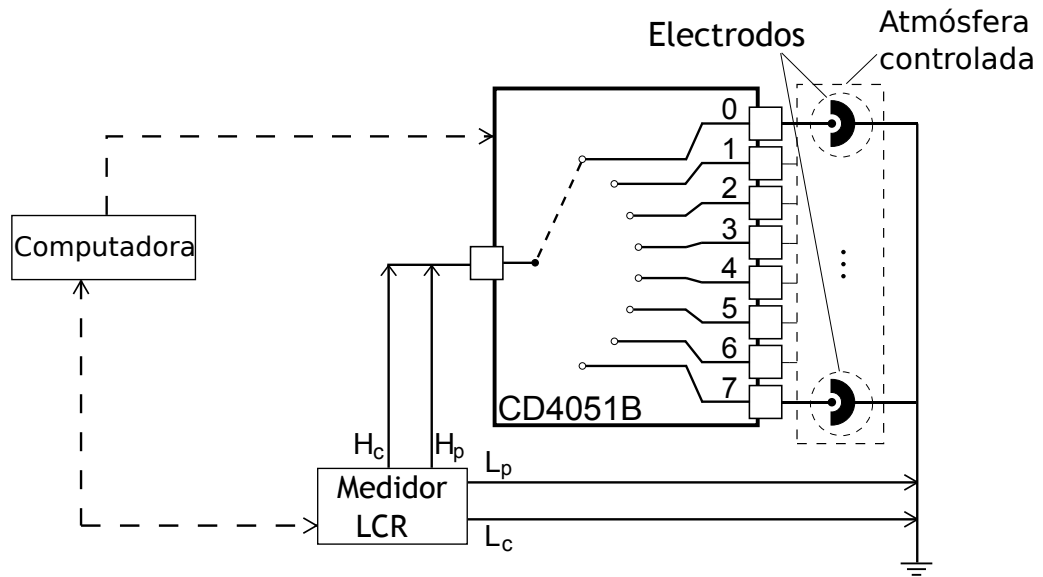
Finalmente, la resistencia y la capacidad equivalentes del microelectrodo modelado como un circuito RC serie se calculan, para cada frecuencia de excitación, mediante las Ecuaciones (A.2.2). Notar que en el cálculo de la impedancia del microelectrodo no aparecen términos asociados al circuito selector de canales, que se encuentra en serie con el mismo. Esto se debe a que la impedancia de dicho circuito, bajo las condiciones de operación definidas en los experimentos de esta tesis, es despreciable frente a la impedancia del microelectrodo (ver el Apéndice V para detalles al respecto). Por lo tanto, el error que se comete al ignorar la impedancia del circuito selector en el cálculo de  $Z_e$  es también despreciable para los fines de este trabajo.

### B.1.1.3. Sistema de medición alternativo

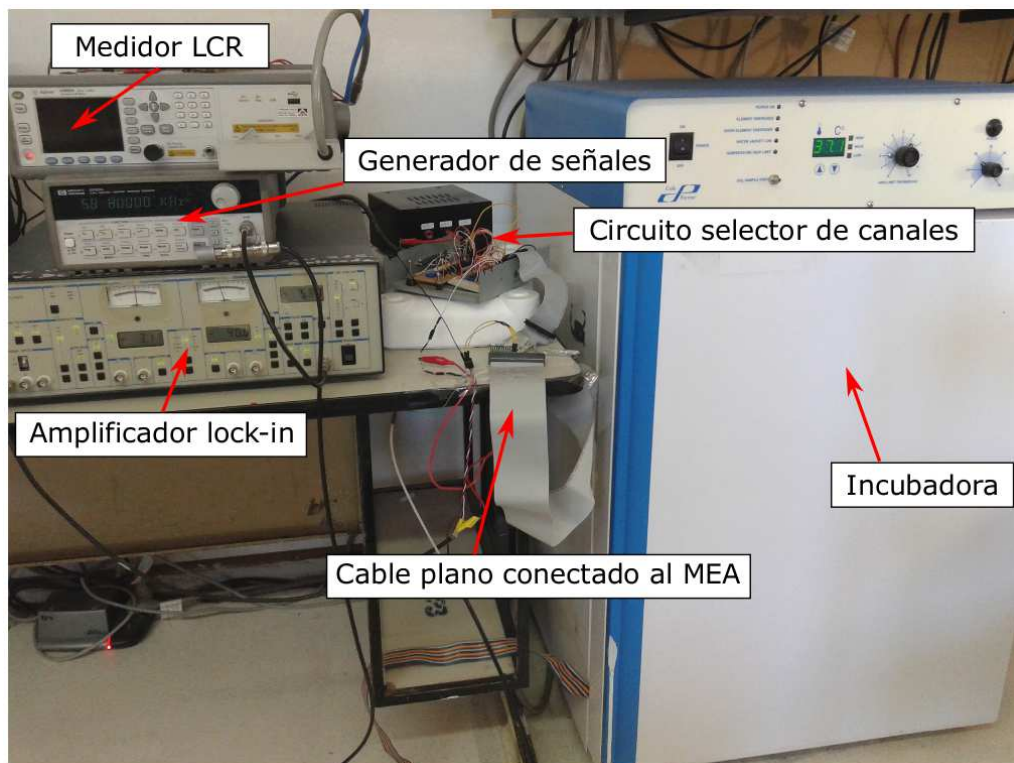
Además del esquema de medición ECIS descrito en la sección anterior, en gran parte de los experimentos de esta tesis se empleó un sistema alternativo en el cual el generador de señales y el amplificador *lock-in* fueron reemplazados por un medidor de impedancia (LCR-meter, Agilent Technologies, E4980a, California, USA)<sup>2</sup>. El esquema de medición completo se muestra en la Figura B.1.7. En todos los experimentos realizados con este sistema, el medidor LCR fue configurado para realizar una medición de 4 terminales (método Kelvin). El equipo inyecta una corriente entre los terminales de corriente *high* ( $H_c$ ) y *low* ( $L_c$ ) y mide la caída de potencial entre los terminales de voltaje *high* ( $H_p$ ) y *low* ( $L_p$ ). Este tipo de medición tiene la ventaja de minimizar los errores causados por las impedancias de los cables y la resistencia de contacto [36]. Los parámetros de medición, tales como amplitud de la señal, frecuencia, tiempo de integración, etc., fueron establecidos de manera particular en cada experimento y se especifican en las secciones correspondientes. Este sistema se utilizó principalmente en los experimentos de herida y cicatrización (Capítulos B.2, B.3 y C.2), ya que permite realizar mediciones de impedancia con señales de excitación de amplitud elevada (mayor a 500 mV<sub>RMS</sub>), mientras que el sistema de medición basado en el amplificador *lock-in* no posee esta funcionalidad. En la Figura B.1.8 se observa una fotografía de la disposición de los equipos involucrados en todas las mediciones de este trabajo.

---

<sup>2</sup>Este instrumento fue facilitado al grupo de trabajo por el Laboratorio de Ingeniería del Centro Atómico Bariloche.



**Figura B.1.7:** Esquema alternativo de medición de impedancia implementado en esta tesis. El medidor LCR se conecta a los microelectrodos mediante 4 terminales (método Kelvin). La computadora cumple las mismas funciones que en el esquema de medición estándar (Figura B.1.5).  $H_c$ : terminal *high* de corriente.  $L_c$ : terminal *low* de corriente.  $H_p$ : terminal *high* de voltaje.  $L_p$ : terminal *low* de voltaje.



**Figura B.1.8:** Arreglo experimental para mediciones ECIS. Se muestran los equipos involucrados en todos los experimentos, a saber: el generador de señales, el amplificador *lock-in*, el medidor LCR, el circuito selector de canales y la incubadora. También se observa el cable plano conectado al MEA (el cual se encuentra dentro de la incubadora), que en este caso es del tipo W1E20 (Sección C.1.4.5.3). El generador de señales, el *lock-in* y el medidor LCR están conectados a una computadora (no mostrada en la figura).

#### B.1.1.4. Software de control y procesamiento

Todas las mediciones realizadas en esta investigación, tanto con el sistema de medición estándar como con el alternativo, fueron controladas mediante software desarrollado como parte de este trabajo, utilizando el lenguaje Microsoft Visual Basic 2005. El procesamiento de los datos resultantes se realizó con programas también desarrollados como parte de este trabajo empleando el software Matlab 2007<sup>3</sup>.

### B.1.2. Líneas celulares

Se conoce como *células primarias* a aquellas provenientes directamente de organismos vivos sin pasar por procesos de mutación inducidos en el laboratorio. Una *línea celular*, en cambio, consiste en un conjunto de células que provienen de un organismo multicelular y que fueron modificadas deliberadamente, a través de mecanismos de mutación, para que puedan realizar la división celular indefinidamente (se las conoce como “inmortalizadas”) [37]. Esto permite que puedan ser subcultivadas por largos períodos de tiempo en el laboratorio, lo cual resulta de suma importancia particularmente para investigaciones en medicina, biología y bioingeniería. Si bien las líneas celulares no se comportan de manera exactamente igual a las células primarias, tienen un costo más bajo, son fáciles de utilizar, su duración es muy extensa (ver Sección B.1.3.4) y no incurren en los problemas éticos asociados al uso de tejido animal y humano en trabajos de investigación. Por último, una línea celular es un conjunto “puro” en el sentido de que está formado por células que son todas idénticas entre sí y por lo tanto poseen las mismas propiedades, haciendo que los resultados obtenidos mediante su uso sean consistentes y reproducibles de forma controlada en cualquier laboratorio del mundo.

La mayoría de las células utilizadas en esta tesis fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) [38], organización que se encarga de la producción y distribución de materiales biológicos estandarizados (entre ellos, microorganismos y líneas celulares).

#### B.1.2.1. Línea MDCK

Las células *Madin Darby Canine Kidney tipo II* (MDCK-II, abreviado MDCK a lo largo de esta tesis) son células epiteliales normales de riñón canino [39]. Esta línea celular proviene de la ATCC (código PTA-6500), y fue obtenida a través de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC).

A pesar de que esta línea celular no está involucrada directamente en los objetivos planteados en esta tesis, la misma ha sido ampliamente utilizada en investigaciones asociadas a la técnica ECIS [11–13], ya que presenta un gran nivel de adherencia y su respuesta eléctrica

---

<sup>3</sup>El Laboratorio de Cavitación y Biotecnología cuenta con las licencias necesarias para utilizar este *software*. Para consultas sobre los programas desarrollados, enviar un e-mail a [fabiangiana@gmail.com](mailto:fabiangiana@gmail.com).

está bien caracterizada. Por lo tanto, en este trabajo fue empleada para evaluar nuevos dispositivos y técnicas, y de esta manera poder comparar los resultados obtenidos con trabajos realizados por otros autores y en otras instituciones.

#### B.1.2.2. Línea IOBA

La línea celular IOBA-NHC<sup>4</sup> (Instituto Oftalmológico Barcelona - *Normal Human Conjunctive*) [40] proviene de tejido epitelial normal de conjuntiva<sup>5</sup> humana. La misma había sido utilizada anteriormente por el equipo de trabajo y se contaba con el conocimiento y los reactivos químicos necesarios para su cultivo. Las células IOBA-NHC presentan características de adherencia muy diferentes a las células MDCK, y fueron utilizadas en los primeros experimentos de discriminación realizados en este trabajo [31] .

#### B.1.2.3. Línea NMuMG

Las células NMuMG<sup>6</sup> (*Normal Murine Mammary Gland*) provienen de tejido epitelial normal de glándula mamaria de ratón [41] y se utilizaron como referencia de células normales en todos los estudios de discriminación presentados en esta tesis. Esta línea celular está certificada por la ATCC (código CRL-1636). Una micrografía de un cultivo de células NMuMG se muestra en la Figura B.1.9(a).

#### B.1.2.4. Línea LM3

Las células LM3 (*Murine Mammary Adenocarcinoma*) provienen de tejido epitelial canceroso de mama de ratón y fueron aisladas en el Instituto Roffo (Buenos Aires, Argentina) [42]. Estas células tienen un origen genéticamente muy cercano a las células normales NMuMG, y fueron utilizadas como referencia de células transformadas en todos los estudios de discriminación presentados en esta tesis. Una micrografía de un cultivo de células LM3 se muestra en la Figura B.1.9(b).

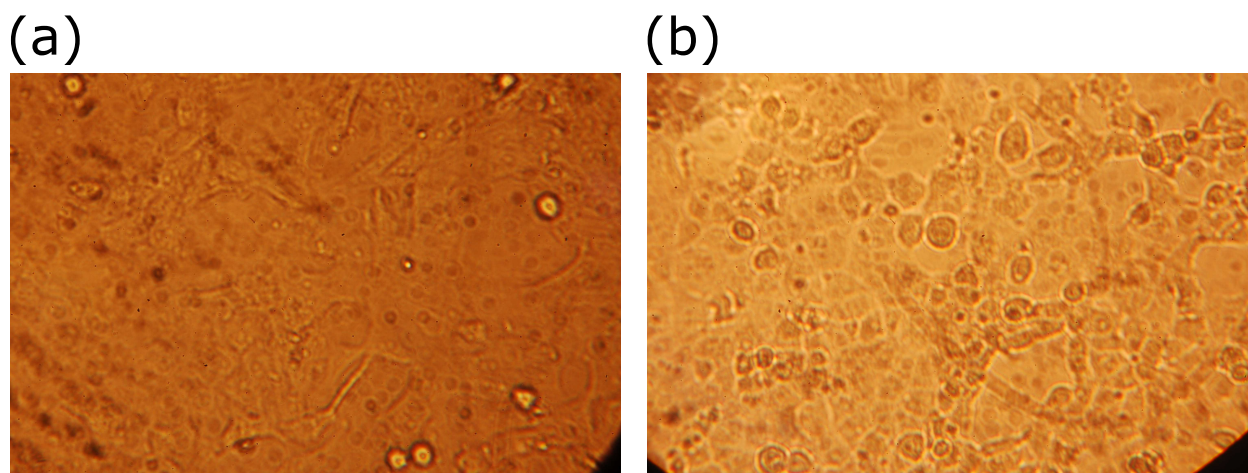
---

<sup>4</sup>Las células IOBA-NHC utilizadas en este trabajo fueron donadas por el Dr. Alejandro Berra y la Dra. Julia Tau.

<sup>5</sup>La conjuntiva es la membrana mucosa transparente que recubre el interior de los párpados y la mayoría de la superficie externa del globo ocular.

<sup>6</sup>Las líneas celulares NMuMG y LM3 fueron donadas al equipo de trabajo por la Dra. Soledad Bustillo, del Laboratorio de Cultivos Celulares de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina).





**Figura B.1.9:** Micrografías de cultivos de células NMuMG (a) y LM3 (b), tomadas con un microscopio invertido con un aumento de 40x.

### B.1.3. Técnicas de cultivo

#### B.1.3.1. Medios de cultivo

Para los experimentos realizados con células MDCK, se preparó un medio de cultivo según protocolos establecidos en la literatura [43]. Se utilizó como base el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM F-12, Gibco) con una concentración de 87 % en la solución final, el cual fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de una solución antibiótica/antifúngica (que contiene penicilina, estreptomycin y fungizona) y 2 % de buffer HEPES. La conductividad eléctrica medida de esta solución fue de  $19,22 \text{ mS.cm}^{-1}$ .

Para los experimentos de discriminación presentados en el capítulo B.2, el medio de cultivo utilizado se preparó en base a recomendaciones brindadas personalmente por un profesional experimentado en el cultivo de las líneas celulares NMuMG y LM3 (S. Bustillo, comunicación personal, 9 de marzo de 2016). Dicho medio de cultivo estaba compuesto por 57 % DMEM F-12, 30 % Modified Eagle's Medium (MEM, Gibco), 10 % FBS, 1 % aminoácidos no esenciales y 2 % buffer HEPES. El pH final de los dos medios de cultivo descritos fue de 7,4.

#### B.1.3.2. Atmósfera controlada

Los cultivos celulares empleados en esta tesis fueron mantenidos, durante los experimentos, en el interior de una incubadora bajo las siguientes condiciones controladas: temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  y aproximadamente 80 % de humedad relativa. La temperatura se reguló mediante un sistema de control térmico que forma parte de la incubadora. El  $\text{CO}_2$  fue almacenado en tubos destinados a tal fin y mediante una válvula se reguló la presión de salida. Tanto el  $\text{CO}_2$  como el aire ingresaron a la incubadora a través de sendas mangueras



para gases, y la concentración deseada se alcanzó mediante la regulación de los caudales de ambos gases por medio de caudalímetros calibrados a tal fin. La elevada humedad ambiente se logró depositando una bandeja con agua esterilizada dentro de la incubadora, y renovando su contenido periódicamente.

Durante la realización de los experimentos, las células fueron mantenidas dentro de *flasks* (recipientes estándares de cultivo) en el interior de la incubadora y bajo las condiciones mencionadas hasta que fueron sembradas en los MEAs.

Todas las mediciones de microelectrodos desnudos fueron realizadas bajo estas mismas condiciones controladas.

### B.1.3.3. Siembra

En primer lugar, se realizó un pretratamiento de las superficies de cultivo agregando 200  $\mu$ l de una solución 10 mM de L-cisteína en agua en cada *well*. El sistema se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, con el objeto de permitir que se forme una capa de pasivación<sup>7</sup>. Luego se vació el contenido de los *wells* y se realizaron dos lavados consecutivos con agua estéril. Este procedimiento se realizó con el objeto de mejorar la repetibilidad de los experimentos [44]. Luego de este pretratamiento, se agregó medio de cultivo en los *wells* a utilizar y se dejó reposar el sistema durante aproximadamente 24 h antes de realizar la inoculación de las células. El protocolo de siembra se detalla en el Apéndice I, e incluye tanto la inoculación de *wells* para realizar experimentos como la siembra en *flasks* para la preservación de las células. La densidad de las suspensiones celulares empleadas como inóculos en todos los experimentos fue de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células·ml<sup>-1</sup>. Los subcultivos, es decir, cultivos sucesivos de células obtenidas a partir de un único cultivo inicial, se realizaron mediante los procedimientos también descritos en el Apéndice I. Se llama *número de pasaje* a la cantidad de veces que una línea celular fue subcultivada.

### B.1.3.4. Preservación

Las células fueron conservadas mediante su congelamiento en tubos crioviales, los cuales fueron mantenidos en un termo de refrigeración de 12 litros de capacidad (12HCL, Taylor-Wharton) con nitrógeno líquido a -196 °C. La recarga del nitrógeno líquido en el termo se realizó una vez por semana. Los protocolos de preservación celular se describen en el Apéndice I.

---

<sup>7</sup>Se llama pasivación a la formación de una película relativamente inerte sobre la superficie de un material, protegiéndolo de la acción de agentes externos.

## Capítulo B.2

# Ensayos de herida y cicatrización

### B.2.1. Resumen

Los ensayos de herida y cicatrización eléctricos (presentados en la Sección [A.2.5](#)) son empleados a menudo para estudiar los mecanismos de migración y proliferación celular. En tales análisis, una monocapa celular adherida a la superficie de un microelectrodo es dañada mediante la aplicación de una corriente eléctrica elevada y la impedancia eléctrica es medida luego para monitorear el proceso de cicatrización. Mediante este tipo de experimentos, la dinámica relativamente lenta del proceso de cicatrización ha sido estudiada en múltiples contextos; no obstante, el proceso de muerte celular (mucho más rápido) no había sido investigado antes de la realización de este trabajo. El análisis de las propiedades eléctricas de un cultivo celular particular durante este proceso de muerte podría brindar información útil en la caracterización de su comportamiento y así diferenciarlo de cultivos de otros tipos de células, lo que resulta de particular interés en el marco de esta investigación (cuyo objetivo es discriminar entre cultivos de células normales y cancerosas). El principal obstáculo que se presenta al intentar obtener información sobre esta dinámica es que el esquema de medición empleado en ensayos de herida y cicatrización típicos no permite llevar a cabo la medición de impedancia del sistema en simultáneo con la aplicación de la señal de herida. En este trabajo, dicha limitación se sobrepuso implementando una estrategia de medición que consiste en la aplicación alternada de ciclos cortos de herida (alto voltaje<sup>1</sup>) y control (bajo voltaje) en electrodos cubiertos con células. Este método permite registrar los cambios rápidos de impedancia durante el régimen transitorio correspondiente al proceso de muerte celular, y tiene una aplicación inmediata en el desarrollo de una técnica de discriminación entre células normales y cancerosas.

Los contenidos principales de este capítulo se detallan a continuación:

- En la Sección [B.2.2](#) se describen los fundamentos y aplicaciones previas del ensayo de

---

<sup>1</sup>En el contexto de este trabajo, utilizamos el término “alto voltaje” para referirnos a valores de amplitud de la señal de excitación que inducen daños en las células. No se lo debe confundir con el término análogo utilizado en la jerga del transporte de energía eléctrica.

herida y cicatrización eléctrico.

- En la Sección B.2.3 se describe el dispositivo experimental utilizado (diferente al que se emplea en ensayos típicos) y las técnicas desarrolladas para obtener mediciones de impedancia durante la fase de muerte celular.
- En la Sección B.2.4 se realiza un análisis de la respuesta eléctrica de células MDCK cuando son excitadas con señales no invasivas empleando el esquema de medición propuesto.
- En la Sección B.2.5 se muestran los efectos de la amplitud de la señal de excitación sobre las mediciones de impedancia. En particular, se define la frontera entre amplitudes no invasivas e invasivas.
- En la Sección B.2.6 se presentan los resultados de las mediciones correspondientes a la dinámica de la muerte celular.
- En la Sección B.2.7 se describe la correlación existente entre mediciones de impedancia realizadas a bajo y alto voltaje en electrodos cubiertos con células, y se plantea un sencillo modelo que permite obtener parámetros característicos de dicha correlación.

## B.2.2. Introducción

En la Sección A.2.5 se introdujeron los ensayos de herida y cicatrización eléctricos (WH) y se describieron sus etapas. Muchos estudios fueron realizados para caracterizar el comportamiento de diferentes tipos celulares durante la etapa de cicatrización en ensayos WH [19, 45–47], e incluso se desarrolló un sistema de monitoreo por imágenes del proceso de cicatrización basado en mediciones de impedancia [18]. Sin embargo, hasta el momento no se habían realizado investigaciones poniendo énfasis en el comportamiento de cultivos celulares durante la etapa transitoria rápida del ensayo, es decir, durante la inyección de la corriente de herida. La forma en que las células son alteradas debido a la aplicación de corrientes elevadas podría dar información extra acerca de sus características morfológicas y estructurales, particularmente acerca de los cambios que se producen en la membrana celular, en las propiedades de adhesión al sustrato y en las *tight junctions*. Esta información, junto con la que puede obtenerse durante el proceso de cicatrización, podría llevar a un mejor entendimiento acerca del comportamiento particular de diferentes tipos de células (por ejemplo, normales y cancerosas) en ensayos de herida y cicatrización, lo cual resulta de gran interés en el marco de esta tesis. El objetivo de este capítulo es desarrollar una técnica de medición capaz de registrar información acerca de la dinámica de la muerte celular inducida por la aplicación de corrientes eléctricas elevadas.

A partir de un ensayo WH realizado con un esquema de medición ECIS estándar, puede mostrarse que el proceso de muerte celular ocurre completamente durante la inyección de la corriente de herida; una vez interrumpida ésta, la herida comienza a cicatrizar y no se registran daños posteriores [17]. Esto implica que, para poder obtener información concerniente a la dinámica de la fase de muerte celular en este tipo de ensayos, es necesario medir la impedancia del sistema durante la aplicación de la corriente de herida. Además, debido a la naturaleza rápida de los procesos físicos involucrados en esta fase, resulta mandatorio lograr una elevada velocidad de medición para poder acaparar los cambios que se llevan a cabo. Estas condiciones motivaron la implementación de un esquema de medición alternativo, basado en un medidor LCR capaz de realizar mediciones a alta velocidad, frecuencia variable y voltajes de hasta  $2 V_{\text{RMS}}$  (Sección B.1.1.3). En primer lugar se analizó la respuesta eléctrica de células MDCK a diferentes voltajes, con el objetivo de determinar el mínimo voltaje capaz de inducir la muerte celular con este esquema de medición. Luego, se emplearon dos estrategias de medición diferentes para registrar los cambios rápidos de impedancia durante la fase de muerte celular.

## B.2.3. Materiales y métodos

### B.2.3.1. Células

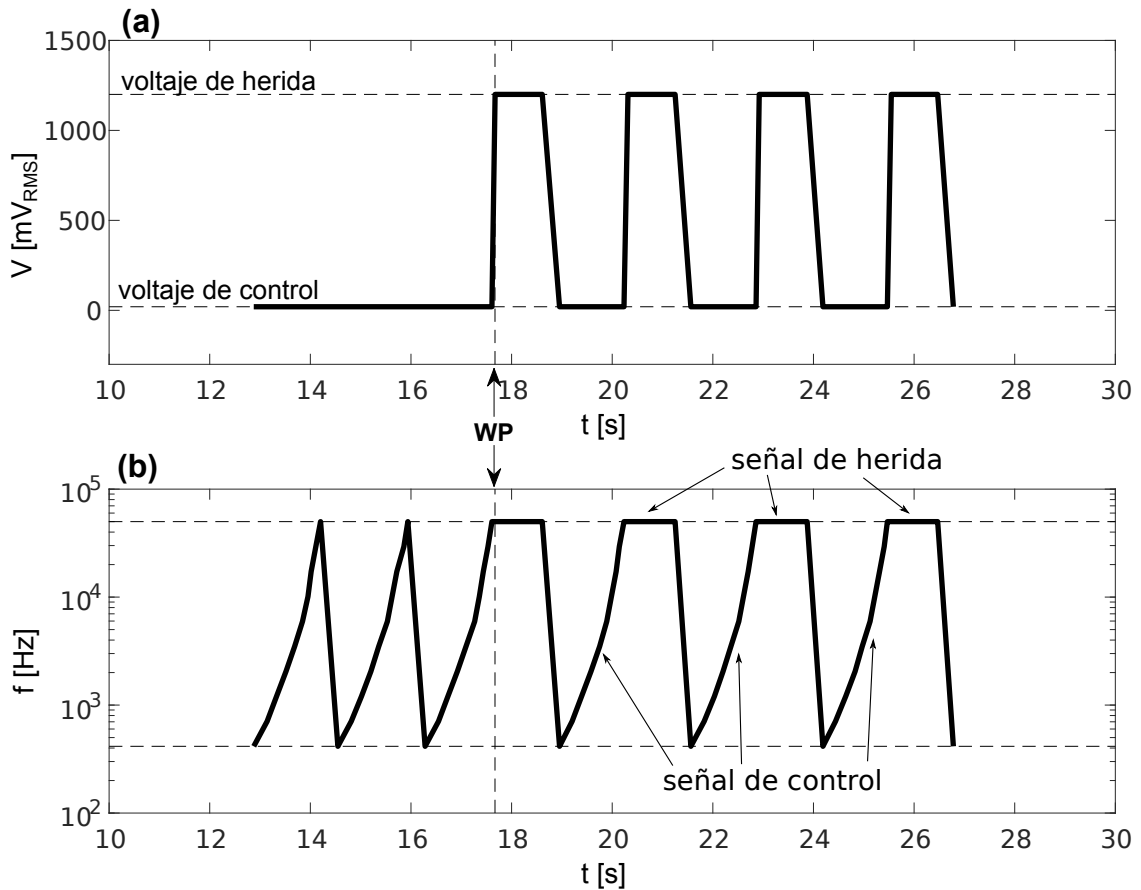
Para los experimentos presentados en este capítulo, se utilizó la línea celular MDCK (Sección B.1.2.1) con números de pasaje 62 - 69.

### B.2.3.2. Dispositivo experimental

Se utilizó el sistema de medición alternativo (Sección B.1.1.3) con microelectrodos comerciales de Au de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro contenidos en un *multiwell* de tipo MW1 (Sección B.1.1.1). Las mediciones de impedancia se llevaron a cabo aplicando una señal sinusoidal de  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  directamente en los electrodos, produciendo una corriente alterna cuya amplitud está en el orden de  $1 \mu\text{A}_{\text{RMS}}$ , lo cual resulta no invasivo para las células [13]. Cada espectro de impedancia consistió en un conjunto de mediciones realizadas a 10 frecuencias logarítmicamente equiespaciadas entre 415 Hz y 50 kHz. Debido a la rapidez del proceso de muerte celular, el medidor LCR se configuró para funcionar a su máxima velocidad estableciendo su tiempo de medición en *short* [36], lo cual permitió obtener una medición a frecuencia fija aproximadamente cada décima de segundo o, equivalentemente, un espectro por segundo. Si bien este modo de medición es el menos preciso, fue suficiente para obtener valores representativos, como se analiza en las secciones siguientes.

### B.2.3.3. Estrategias de medición

En todos los casos, los ensayos de herida y cicatrización se iniciaron una vez alcanzado un estado estacionario en las mediciones de impedancia (ver Sección B.2.4), el cual corresponde a la formación de una monocapa celular confluyente. En ese estado, el medidor LCR se configuró para producir una señal de herida sinusoidal con amplitud fija de 1,2 o 2  $V_{RMS}$  (se ensayaron ambos voltajes en experimentos diferentes) y frecuencia de 50 kHz. Este valor de frecuencia se seleccionó en base a estudios anteriores con el objeto de asegurar campos eléctricos uniformes y elevados [13], y el rango de voltajes de la señal de herida se eligió luego de analizar la respuesta eléctrica de las células a diferentes voltajes (Sección B.2.5). La impedancia del sistema fue medida a lo largo de todo el ensayo, incluyendo la dinámica de la muerte celular, y los experimentos fueron repetidos en diferentes *wells* con células. Para poder obtener estos datos, se adoptaron dos estrategias de medición diferentes, que se describen a continuación.



**Figura B.2.1:** Representación de la señal de herida correspondiente a la segunda estrategia de medición empleada en este trabajo para registrar los cambios rápidos de impedancia durante la fase de herida del ensayo. La amplitud de excitación fue en este caso de 1.2  $V_{RMS}$ . Las flechas señaladas como “WP” indican el inicio de la fase de herida. (a) Voltaje RMS de la señal en función del tiempo. Las líneas cortadas horizontales inferior y superior representan los voltajes de control y de herida, respectivamente. (b) Frecuencia de la señal en función del tiempo. Las líneas cortadas horizontales inferior y superior representan las frecuencias mínima y máxima del espectro (415 Hz y 50 kHz, respectivamente). Para mayor claridad, sólo se muestra una porción de la señal completa.

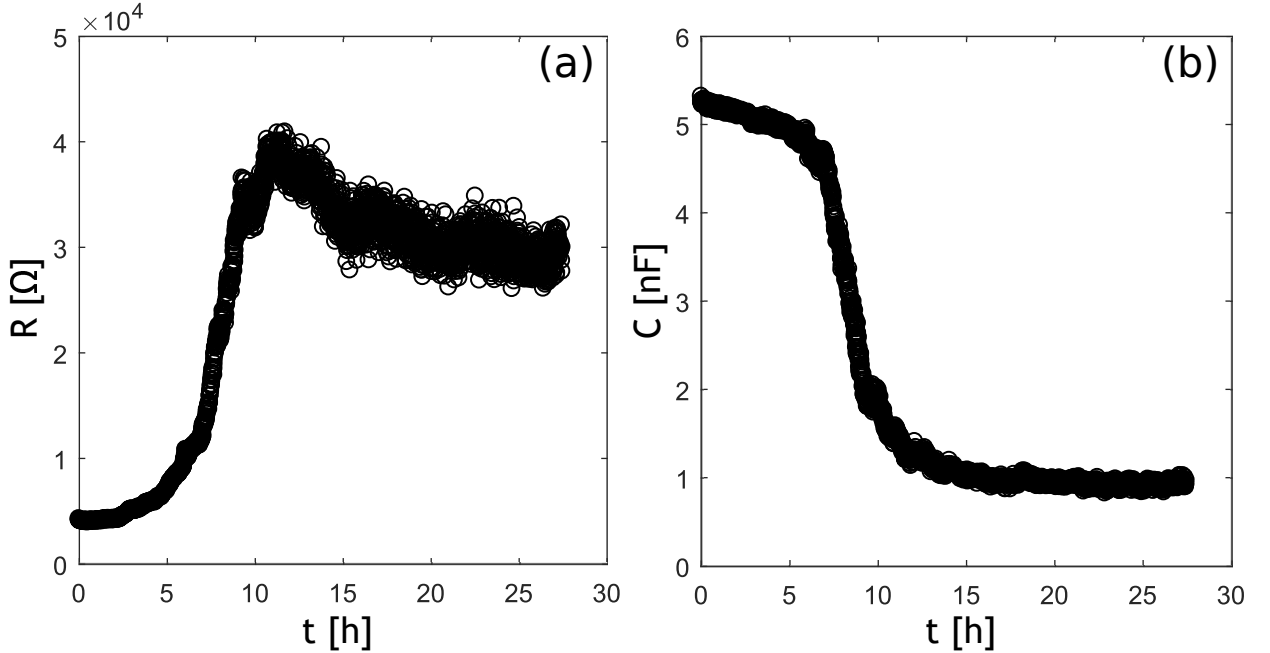
La primera estrategia consistió en aplicar la señal de herida continuamente durante 30 s y utilizarla para medir la impedancia del sistema. Si bien este método hizo posible obtener curvas con alta resolución temporal que representan los cambios de resistencia y capacidad que ocurren durante la muerte celular, su principal desventaja radica en que las mediciones fueron tomadas a una frecuencia fija de 50 kHz, mientras que un análisis espectral brindaría un conjunto de datos más completo para alcanzar una interpretación biológica precisa de los resultados. Otro inconveniente con esta técnica de medición fue una discontinuidad observada en las curvas de resistencia y capacidad debido a la diferencia entre los voltajes de medición, a saber,  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  antes y después de la fase de herida y  $1,2$  o  $2 \text{ V}_{\text{RMS}}$  durante dicha fase. Esto se discute con más detalle en la Sección B.2.5.

La segunda estrategia de medición consistió en alternar ciclos de herida de 1 s de duración con una medición espectral rápida a  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ , repitiendo este procedimiento hasta alcanzar un tiempo total de aplicación de la corriente de herida de 10 minutos. Este mayor tiempo de exposición fue seleccionado con el propósito de asegurar el registro de la dinámica completa de la muerte celular, es decir, entre los estados estacionarios correspondientes al electrodo confluyente (previo a la herida) y al electrodo desnudo (posterior a la herida). La Figura B.2.1 muestra el voltaje RMS y la frecuencia de la señal sinusoidal aplicada a los electrodos para un voltaje de herida de  $1,2 \text{ V}_{\text{RMS}}$ . El ensayo comienza con una fase de control donde la amplitud de la señal es establecida en  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  y la frecuencia se varía a lo largo del espectro. En el ejemplo mostrado en la Fig. B.2.1, la fase de herida comienza en  $t \simeq 17,7$  s. Durante esta fase, un ciclo formado por la aplicación sucesiva de una señal de herida y una de control es repetido durante un tiempo total de 10 minutos. En la parte del ciclo correspondiente a la señal de herida, que tiene una duración aproximada de 1 s, la amplitud de la señal se establece en  $1,2 \text{ V}_{\text{RMS}}$  y la frecuencia se mantiene en un valor constante de 50 kHz. En la parte de control del ciclo, la señal que se aplica es idéntica a la que se emplea en la fase de control. Finalmente, la fase de cicatrización del ensayo (no mostrada en la figura) comienza inmediatamente después de la fase de herida, y la señal utilizada para la medición es también idéntica a la señal utilizada en la fase de control. Con esta segunda variante de la técnica, se logró obtener un conjunto de mediciones espectrales durante toda la fase de herida para cada experimento.

## B.2.4. Análisis de impedancia de células MDCK

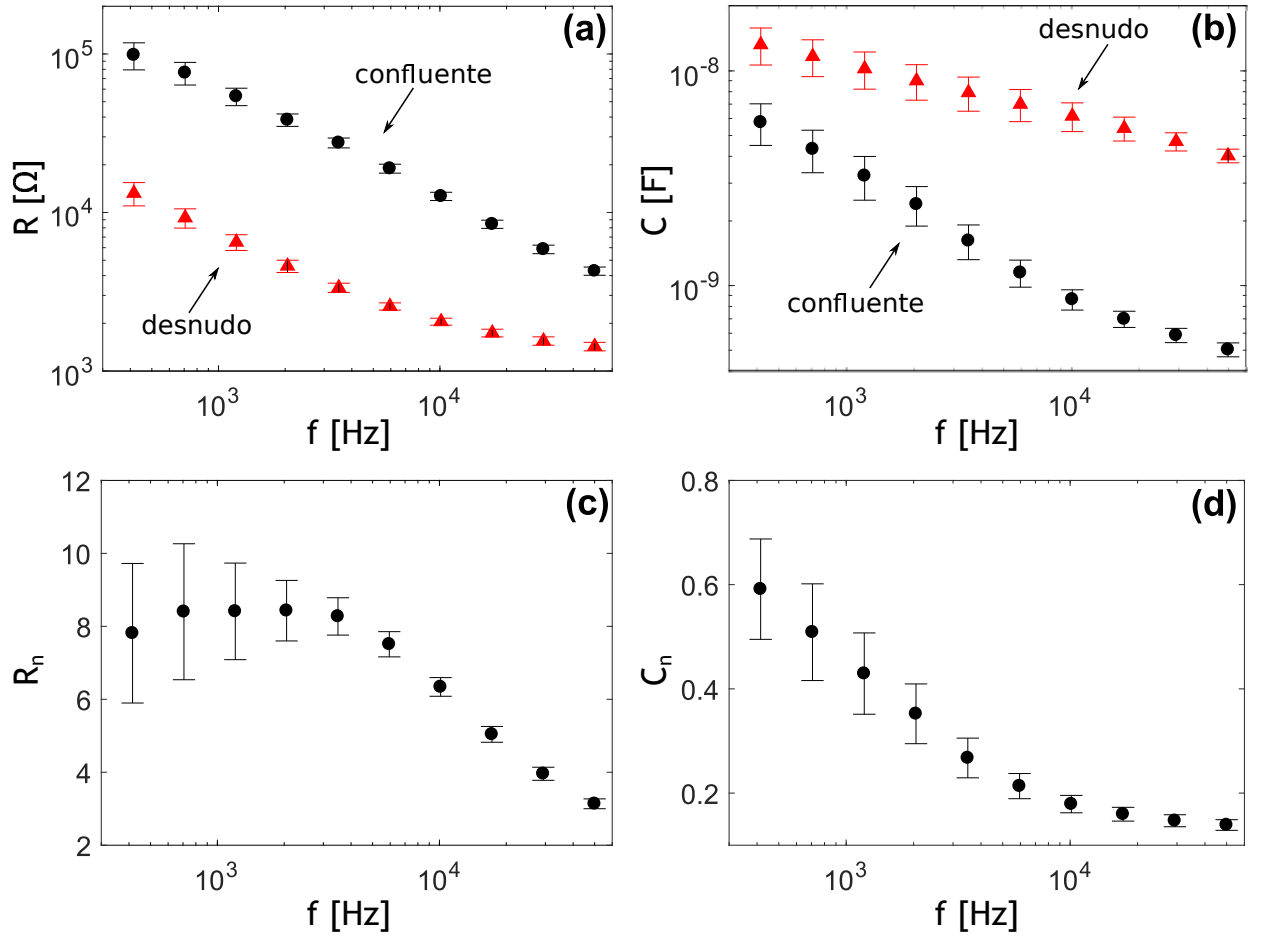
La Figura B.2.2 muestra la evolución temporal de la resistencia y la capacidad equivalentes de un microelectrodo luego de sembrarlo con células MDCK, medidas a  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  y 3492 Hz. Las curvas exhiben el comportamiento típico de esta línea celular cuando se cultiva bajo condiciones normales, y los resultados concuerdan con aquellos obtenidos utilizando el sistema de medición estándar [13, 17]. El valor medido de la resistencia aumenta desde aproximadamente  $4 \text{ k}\Omega$ , correspondiente al electrodo desnudo, hasta aproximadamente  $30 \text{ k}\Omega$

para el electrodo cubierto con una monocapa confluyente de células. Como puede observarse, luego de aproximadamente 21 h el sistema alcanza un estado estacionario y presenta fluctuaciones alrededor de un valor medio, las cuales son características de los cultivos celulares vivos [27] y que corresponden al fenómeno de *micromotion* (Sección A.2.4). De manera correspondiente, el valor medido de la capacidad disminuye desde aproximadamente 5,2 nF hasta un valor estacionario de aproximadamente 1 nF. Cuantitativamente, el tiempo  $t_s$  correspondiente al inicio del estado estacionario se determinó como se indica en el Apéndice III. Dicha determinación se realizó en un total de 5 experimentos y, a partir de esos datos, se adoptó para todos los demás experimentos un tiempo mínimo de 24 horas antes de realizar los ensayos de herida y cicatrización, con el objeto de asegurar que el sistema se encontraba en dicho estado estacionario.



**Figura B.2.2:** Evolución temporal de la resistencia y capacidad equivalentes de un microelectrodo luego de la siembra de células MDCK en el *well* que lo contiene. Las mediciones fueron realizadas con el esquema ECIS alternativo (Sección B.1.1.3), empleando el medidor LCR a 20 mV<sub>RMS</sub> y 3492 Hz. Las células fueron sembradas en  $t = 0$ . (a) Resistencia en función del tiempo. (b) Capacidad en función del tiempo.

Las Figuras B.2.3(a) y B.2.3(b) muestran la resistencia y capacidad promedio, respectivamente, de 10 microelectrodos diferentes en función de la frecuencia (espectros). Se muestran dos conjuntos de datos en cada figura, uno correspondiente a los electrodos desnudos y el otro a los electrodos cubiertos en el estado de confluencia. Como puede apreciarse, tanto la resistencia como la capacidad disminuyen a medida que la frecuencia aumenta, pero la forma de cada curva es modificada por la presencia de las células. Como se explicó en la Sección A.2.3, el modelo de la respuesta eléctrica propuesto por Giaever y Keese predice los cambios de impedancia mostrados en la Figura B.2.3 para microelectrodos cubiertos con una monocapa celular en el estado estacionario.



**Figura B.2.3:** Propiedades eléctricas promedio de 10 microelectrodos desnudos (triángulos) y cubiertos con una monocapa confluyente de células MDCK (círculos) en función de la frecuencia, medidas con el sistema alternativo descrito en la Sección B.1.1.3 a 20 mV<sub>RMS</sub>. (a) Resistencia equivalente en serie. (b) Capacidad equivalente en serie. (c) Resistencia normalizada. (d) Capacidad normalizada. Las barras de error representan el error estándar.

Los espectros fueron normalizados como se explicó en la Sección A.2.3, y los resultados se muestran en las Figuras B.2.3(c) y B.2.3(d) para la resistencia y capacidad, respectivamente. La diferencia entre los valores de resistencia de electrodos desnudos y cubiertos es mayor en el rango de frecuencias comprendido entre 1 y 4 kHz, como indica el máximo de la curva de resistencia normalizada. Este es el comportamiento típico de un microelectrodo de 250 μm de diámetro cubierto con una monocapa de células MDCK en confluencia [11]. Cuanto más fuertes son las uniones intercelulares y de las células con el sustrato, tanto mayor resulta el valor de la resistencia normalizada máxima (se han reportado valores entre 10 y 15) y menor la frecuencia a la que ocurre dicho valor (tiende a 1 kHz). Los resultados presentados en la Figura B.2.3 también están en concordancia con aquellos obtenidos previamente con el sistema de medición estándar [13]. Además, las células MDCK causan una caída en la capacidad del sistema y los valores se apartan más de los correspondientes al electrodo desnudo a medida que aumenta la frecuencia. A baja frecuencia, por el contrario, ambos valores convergen y la capacidad dominante corresponde a la doble capa de Helmholtz [48].

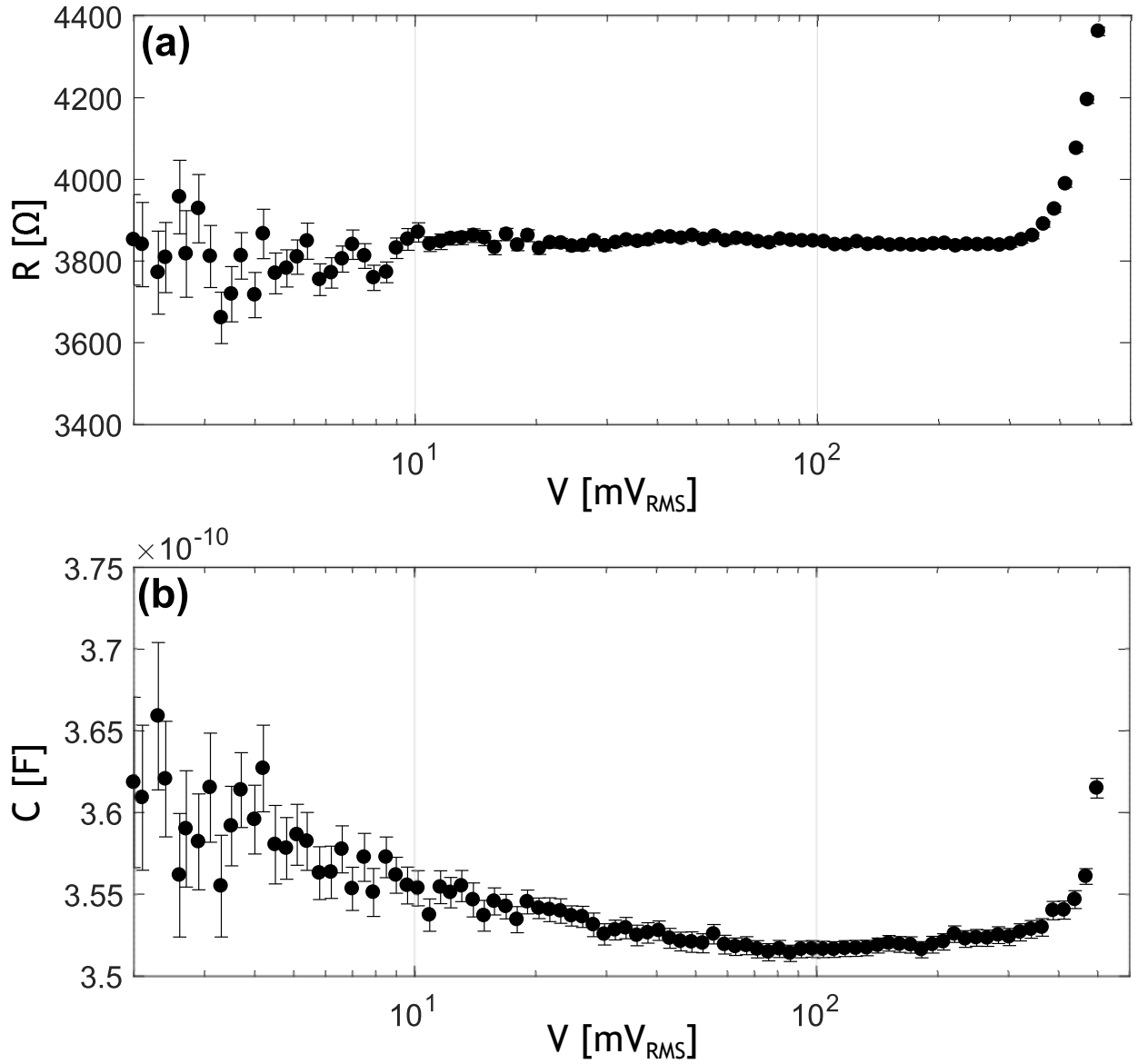


En todos los casos, el error en las mediciones de resistencia y capacidad fue mayor a bajas frecuencias debido a una menor precisión del medidor LCR.

## B.2.5. Respuesta eléctrica a diferentes voltajes

Según se ha reportado en estudios anteriores, las mediciones ECIS realizadas con corriente alterna de amplitud menor a  $1 \mu\text{A}_{\text{RMS}}$  no producen efectos detectables en las células [17]. Un ensayo WH típico hace uso de una corriente alterna de alta frecuencia y amplitud del orden de  $1 \text{ mA}_{\text{RMS}}$  para inducir la muerte celular [17, 49]. En los experimentos presentados en este capítulo, la impedancia del microelectrodo cubierto a la máxima frecuencia medida (50 kHz) tiene un valor medio de aproximadamente  $8 \text{ k}\Omega$ . Por lo tanto, según la ley de Ohm, para lograr ese orden de magnitud en la corriente sería necesario aplicar una señal de aproximadamente  $8 \text{ V}_{\text{RMS}}$  de amplitud, valor que cuadruplica el máximo que es capaz de entregar el medidor LCR empleado ( $2 \text{ V}_{\text{RMS}}$ ). No obstante esta limitación, hemos observado una pronunciada caída en la resistencia (y un correspondiente incremento en la capacidad) en electrodos cubiertos con células MDCK aplicando voltajes incluso menores a  $2 \text{ V}_{\text{RMS}}$ , lo que corresponde a amplitudes de corriente menores a  $0,25 \text{ mA}_{\text{RMS}}$ . Estos cambios en la impedancia del sistema son característicos del proceso de muerte celular.

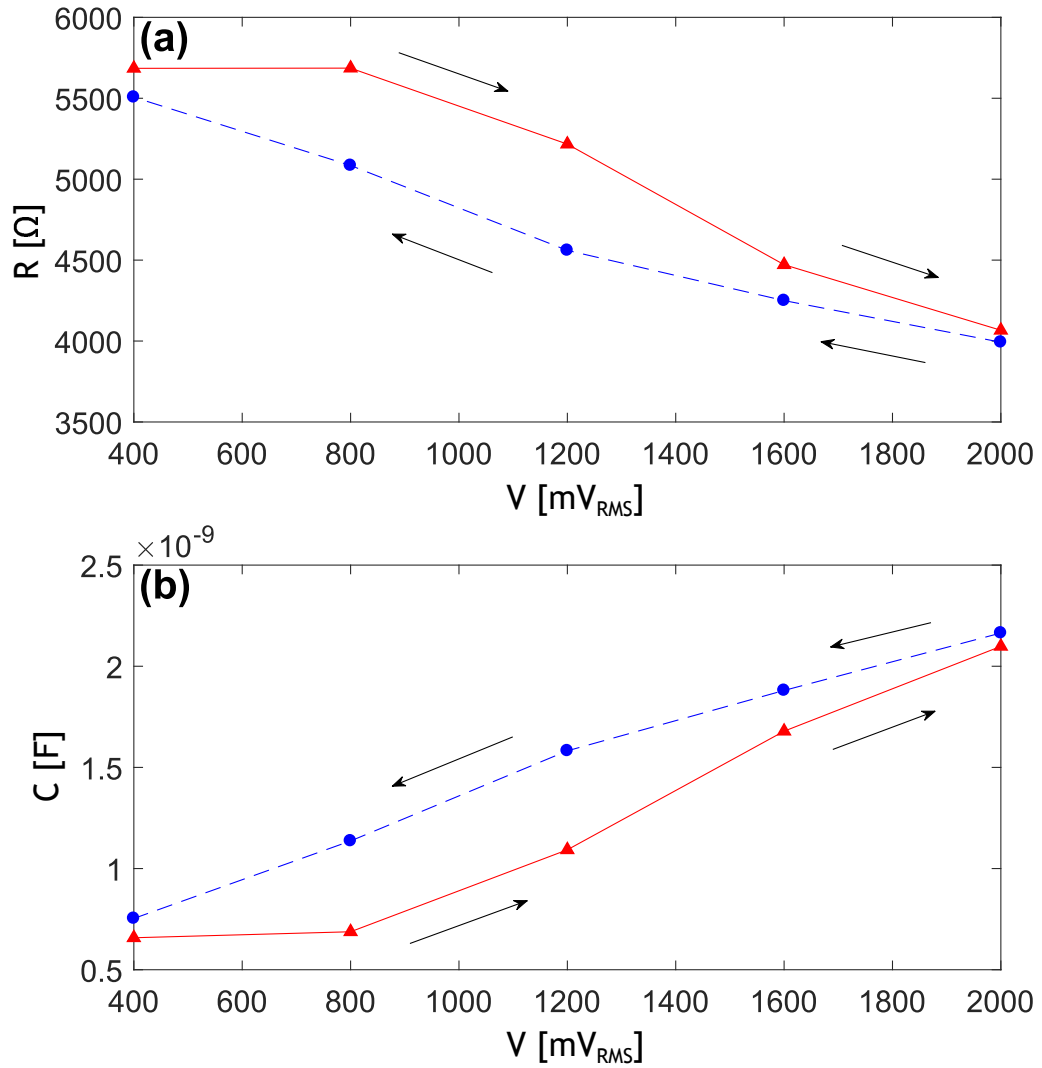
Con el objeto de hallar la frontera entre un voltaje no invasivo y uno que produzca daños detectables en las células, se realizó una serie de mediciones aplicando un barrido de voltaje. Las Figuras B.2.4(a) y B.2.4(b) muestran los resultados correspondientes a un barrido de bajo voltaje entre 2 y  $500 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  a 50 kHz. La medición se realizó incrementando el voltaje gradualmente, manteniendo cada amplitud durante un tiempo de aproximadamente 1 s y realizando mediciones intermedias con la señal de control de  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ . Una vez alcanzado el voltaje máximo de  $500 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ , se realizó el barrido en forma descendente hasta el valor mínimo de  $2 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ . Este ciclo de ascenso/descenso se repitió 10 veces consecutivas en cada experimento. Como cabe esperar, el ruido en las mediciones es mayor a bajas amplitudes de la señal de medición, y por lo tanto las correspondientes barras de error en los gráficos son mayores. A  $V \simeq 20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  el error es menor a 0,4 % tanto para la resistencia como para la capacidad, y por lo tanto la amplitud seleccionada para la señal de control resulta adecuada.



**Figura B.2.4:** Efecto de la amplitud de la señal en las mediciones de impedancia. Los datos corresponden a un microelectrodo cubierto con células MDCK, a una frecuencia fija de 50 kHz y utilizando el esquema de medición alternativo (Sección B.1.1.3). (a) Resistencia equivalente en función del voltaje de medición. (b) Capacidad equivalente en función del voltaje de medición. Las barras de error representan el error estándar.

Un comportamiento interesante puede observarse cuando el voltaje supera los 300  $\text{mV}_{\text{RMS}}$ , donde tanto la resistencia como la capacidad tienden a incrementar su valor por encima del valor medio registrado a amplitudes menores. Este fenómeno fue observado tanto para microelectrodos desnudos como para cubiertos, pero su efecto resultó mucho mayor en los últimos. Estos valores de impedancia que dependen del voltaje indican que la relación entre el voltaje aplicado y la corriente resultante es no lineal para voltajes mayores a 300  $\text{mV}_{\text{RMS}}$ . Sin embargo, las pequeñas barras de error observadas entre 300 y 500  $\text{mV}_{\text{RMS}}$  sugieren que la señal aplicada no induce una alteración irreversible en las células. Se midieron espectros de impedancia antes y después de estos experimentos y los resultados (no mostrados en la figura) confirman que el barrido de voltaje no indujo la muerte celular.

Un comportamiento diferente se observa para voltajes superiores a 800 mV<sub>RMS</sub>, como se muestra en la Figura B.2.5. En este gráfico se presentan los resultados de un barrido de alto voltaje entre 400 y 2000 mV<sub>RMS</sub> a 50 kHz realizado sobre un microelectrodo cubierto en el estado de confluencia. Cada amplitud fue mantenida durante aproximadamente 0.1 s y seguida de una medición espectral de control a 20 mV<sub>RMS</sub>. La figura muestra únicamente las mediciones a alto voltaje correspondientes a un único ciclo de ascenso/descenso.



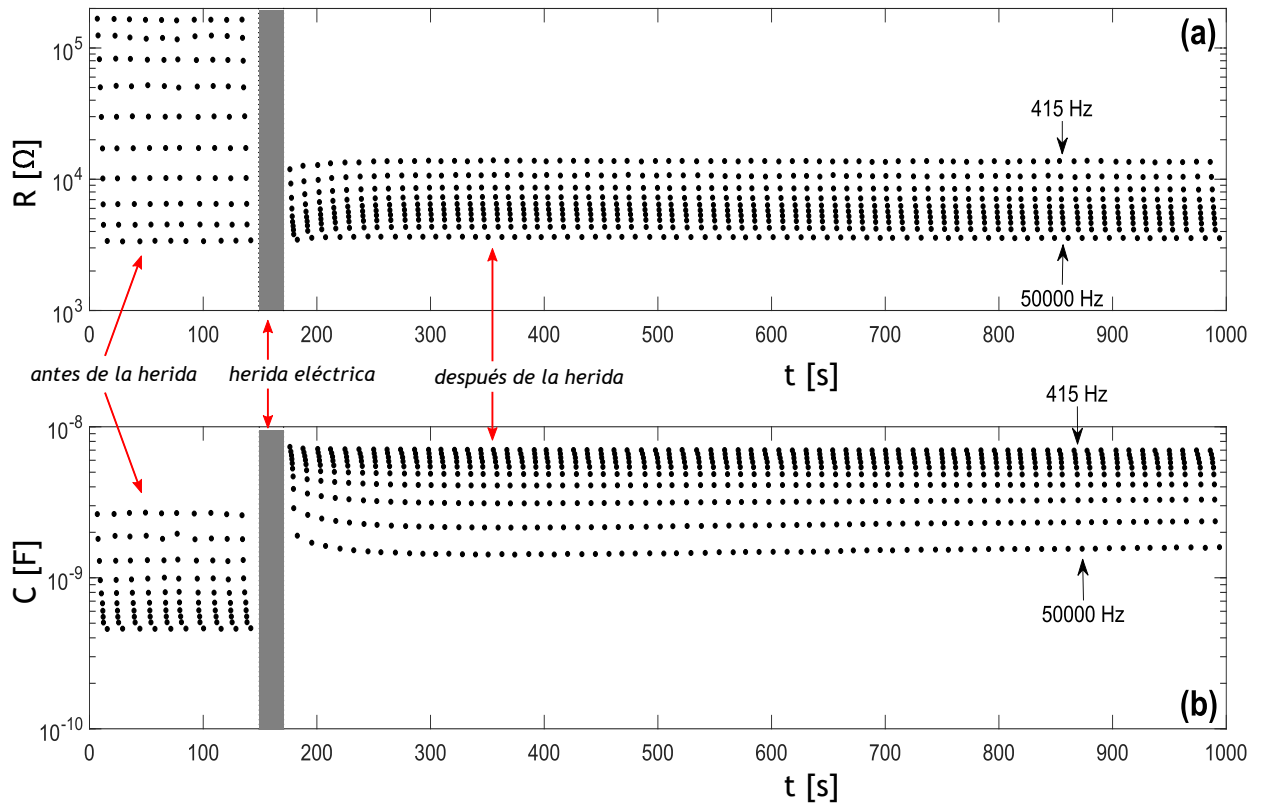
**Figura B.2.5:** Efecto de amplitudes de excitación elevadas sobre la resistencia (a) y capacidad (b) equivalentes de células MDCK. Las mediciones fueron realizadas a 50 kHz con el esquema de medición alternativo. El primer barrido de voltaje (ascendente) se indica con líneas llenas y triángulos, mientras que las líneas cortadas y los círculos representan el segundo barrido (descendente).

En este caso, cuando el voltaje aumenta por encima de los 800 mV<sub>RMS</sub> se observa una disminución en la resistencia y un aumento en la capacidad. Luego de la aplicación del voltaje máximo (2 V<sub>RMS</sub>), la curva correspondiente al barrido descendente describe una trayectoria con histéresis, completamente por debajo de la correspondiente al barrido ascendente en el caso de la resistencia (Figura B.2.5(a)) y completamente por encima de la misma en el caso

de la capacidad (Figura B.2.5(b)). Estos cambios de impedancia indican que los voltajes aplicados inducen un daño en las células. Sin embargo, la aplicación de un único ciclo del barrido de voltaje como el que se muestra en la figura no es suficiente para producir un cambio significativo en los valores de impedancia como el que se observaría si se indujera la muerte celular. Esto se debe a que las señales de alto voltaje en un ciclo del barrido son aplicadas durante un intervalo de tiempo muy reducido, y es probable que el efecto observado se deba a la generación de poros en las membranas celulares, fenómeno conocido como electroporación [17]. No obstante, con un tiempo mayor de exposición, estas amplitudes de voltaje son suficientes para producir la muerte celular, como muestran los resultados de la Sección B.2.6. Los resultados del barrido de alto voltaje se utilizaron como criterio para la elección del rango de voltajes de herida entre 1,2 y 2,0  $V_{\text{RMS}}$ .

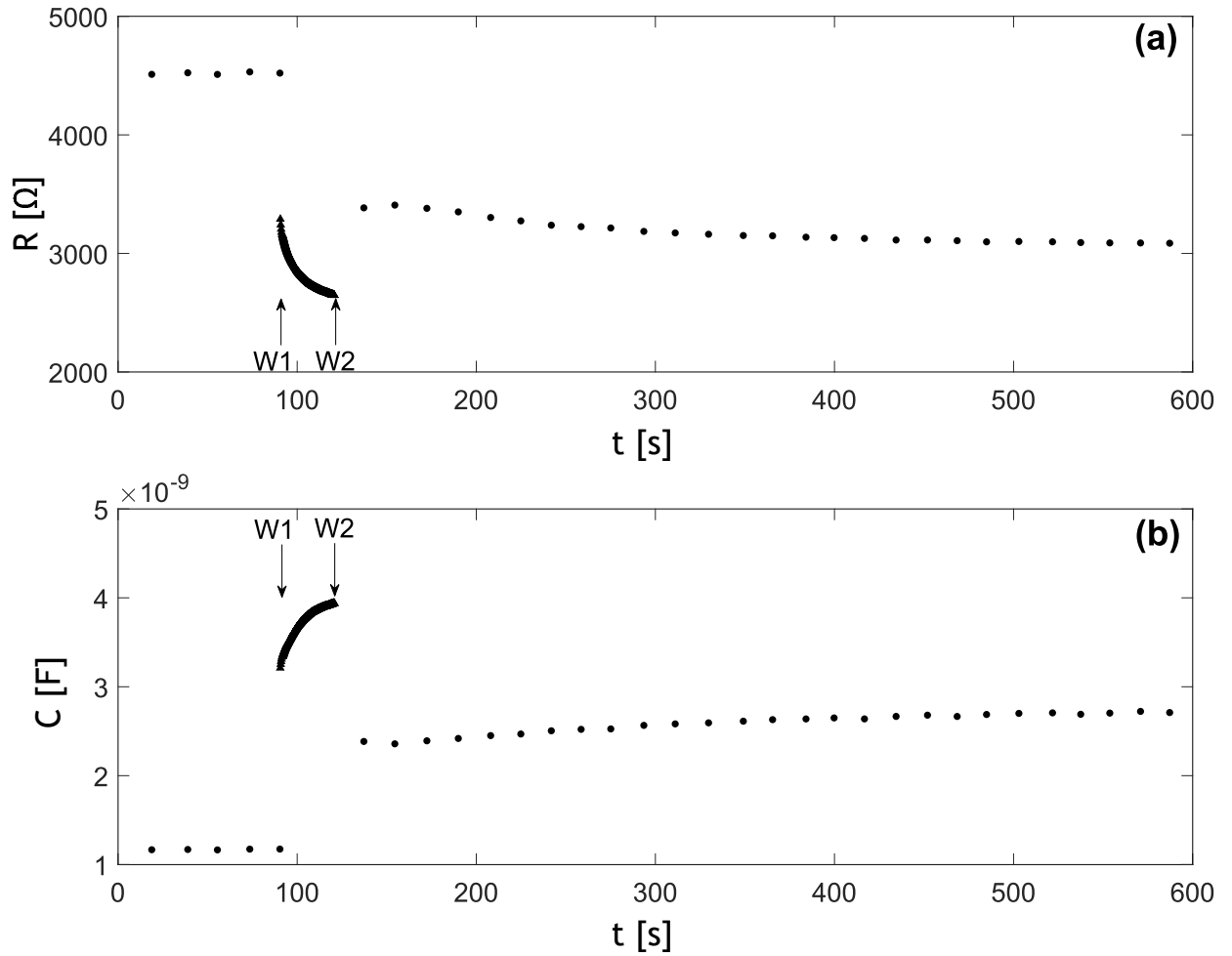
## B.2.6. Dinámica de la muerte celular

La respuesta espectral de un microelectrodo cubierto con células MDCK en confluencia, obtenida con el sistema de medición estándar (utilizando un *lock-in* en lugar del medidor LCR) antes y después de inducir la muerte celular, se muestra en las Figuras B.2.6(a) y B.2.6(b). La zona gris corresponde al intervalo de tiempo durante el cual se aplicó la corriente de herida. Estas figuras muestran las dos consecuencias principales de la herida celular, a saber, una caída pronunciada en la resistencia del sistema y un aumento de su capacidad. Sin embargo, como puede observarse, si bien la medición fue iniciada inmediatamente luego de interrumpir la señal de herida, no fue posible obtener una curva con resolución temporal que registre la caída de resistencia (y el aumento en capacidad) durante la fase de herida. Esto indica que la muerte de las células y su consecuente desprendimiento de la superficie del microelectrodo tienen lugar sólo mientras se hace circular la corriente de herida, después de lo cual el sistema comienza a evolucionar hasta alcanzar nuevamente el estado estacionario correspondiente a una monocapa celular confluyente.



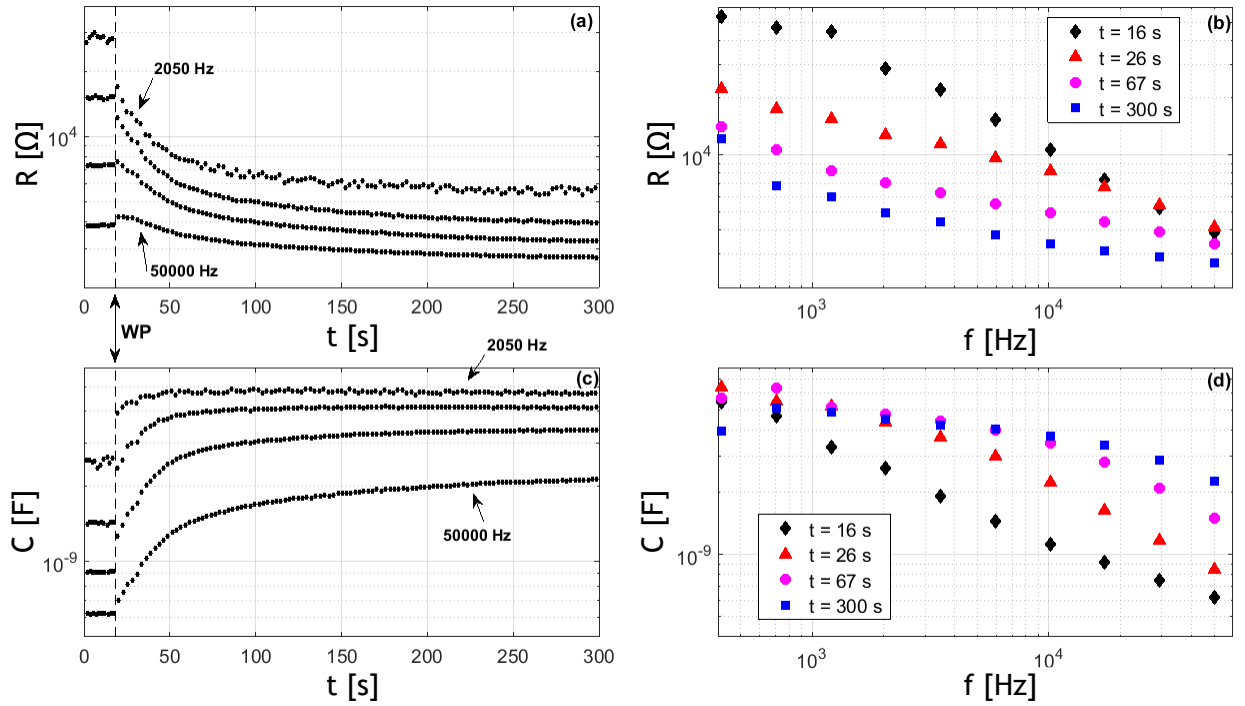
**Figura B.2.6:** Cambios de impedancia observados en un ensayo de herida y cicatrización típico, medidos con el esquema basado en un amplificador *lock-in* (Sección B.1.1.2). Se grafican la resistencia (a) y capacidad (b) equivalentes en función del tiempo, antes y después de la fase de herida. Para cada tiempo, los valores más elevados de ambas magnitudes corresponden a la menor frecuencia del espectro (415 Hz), mientras que los valores más bajos corresponden a la frecuencia mayor (50 kHz).

La primera estrategia empleada para obtener información acerca de la dinámica de la muerte celular fue llevar a cabo el ensayo WH con el esquema de medición alternativo y utilizar la señal de herida de  $2 V_{\text{RMS}}$  y 50 kHz para tomar una medición continua y a frecuencia fija de la impedancia del sistema. La Figura B.2.7(a) muestra la evolución temporal de la resistencia del sistema para este experimento, medida antes, durante y luego del proceso de muerte celular. Una relación no lineal entre la corriente y el voltaje se pone de manifiesto como una discontinuidad en la curva de resistencia durante la aplicación de la señal de herida. Atribuimos este resultado a la diferencia entre los voltajes de medición, a saber,  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  antes y después de la muerte celular y  $2 V_{\text{RMS}}$  durante dicho proceso. Este comportamiento fue observado en todos los experimentos similares realizados, y también puede observarse en la curva de capacidad (Figura B.2.7(b)).



**Figura B.2.7:** Cambios de impedancia observados en un ensayo de herida y cicatrización, medidos con el esquema alternativo basado en un medidor LCR y empleando la primera estrategia de medición descrita en la Sección B.2.3.3. La señal de herida tiene una amplitud de  $2 V_{\text{RMS}}$  y frecuencia de 50 kHz, y fue aplicada durante el intervalo temporal comprendido entre los puntos marcados como W1 y W2. Se grafican la resistencia (a) y capacidad (b) equivalentes en función del tiempo. Ambas magnitudes fueron registradas antes, durante y después de la fase de herida.

Como se indicó en la Sección B.2.3.3, esta estrategia de medición presenta dos problemas principales, a saber, la frecuencia fija de medición y la discontinuidad en las curvas de resistencia y capacidad. Para resolver estos inconvenientes, se realizaron experimentos empleando la segunda estrategia de medición (Sección B.2.3.3) y los resultados se muestran en la Figura B.2.8. Al inicio de la fase de herida, la amplitud de la señal de medición ( $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ ) se cambió al valor correspondiente a la señal de herida, que en el caso de la Figura B.2.8 fue de  $1,2 V_{\text{RMS}}$ . Se hizo circular la corriente de herida durante 1 s, tras lo cual el voltaje se redujo nuevamente a  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  para efectuar una medición espectral de 10 frecuencias. Este procedimiento se repitió hasta que el tiempo de exposición del sistema a la señal de  $1,2 V_{\text{RMS}}$  fue de 10 minutos. La duración promedio de las mediciones a bajo voltaje fue de 1,2 s, y la amplitud de la corriente de herida varió entre 0,2 y 0,3  $\text{mA}_{\text{RMS}}$ .



**Figura B.2.8:** Cambios de impedancia observados en un ensayo de herida y cicatrización, medidos con el esquema alternativo basado en un medidor LCR y empleando la segunda estrategia de medición descrita en la Sección B.2.3.3. Las líneas cortadas señaladas como “WP” indican el inicio de la fase de herida. La señal de herida tiene una amplitud de  $1,2 V_{RMS}$  y una frecuencia fija de 50 kHz, mientras que la señal de control tiene una amplitud de  $20 mV_{RMS}$  y frecuencia variable a lo largo del espectro (ver Figura B.2.1). Las figuras (a) y (c) muestran la resistencia y capacidad equivalentes en función del tiempo, respectivamente, medidas con la señal de control a 4 diferentes frecuencias, a saber: 2,05, 5,95, 17,24 y 50 kHz. Los valores más elevados corresponden a la frecuencia de 2,05 kHz y los más bajos a la frecuencia de 50 kHz. En las figuras (b) y (d) se muestran la resistencia y capacidad en función de la frecuencia para 4 tiempos diferentes durante la fase de herida.

Las Figuras B.2.8(b) y B.2.8(d) muestran los espectros de resistencia y capacidad, respectivamente, a 4 tiempos diferentes durante el experimento. A  $t = 16$  s, dichos espectros corresponden al microelectrodo cubierto en el estado confluyente inmediatamente antes de la fase de herida. A medida que el tiempo aumenta, la herida progresa y tanto la curva de resistencia como la de capacidad se desplazan hacia los valores correspondientes al electrodo desnudo (ver Figuras B.2.3(a) y B.2.3(b)), alcanzando un nuevo estado estacionario luego de aplicar la señal de herida durante aproximadamente 5 - 10 minutos. Como puede observarse, este experimento hizo posible obtener espectros de resistencia y capacidad con resolución temporal durante el proceso de muerte celular. En contraste con la estrategia de medición anterior (Figura B.2.7), en este experimento la amplitud de la señal de medición fue la misma antes, durante y después de la fase de herida, a saber,  $20 mV_{RMS}$ . Los valores de impedancia medidos con la señal de herida también fueron registrados, si bien por claridad no se muestran en la figura.

## B.2.7. Correlación entre mediciones a bajo y alto voltaje

Las curvas de resistencia y capacidad obtenidas con la señal de herida (a 1,2 V<sub>RMS</sub> y 50 kHz) en el experimento presentado en la sección anterior mostraron el mismo comportamiento no lineal que se observa en la Figura B.2.7. Sin embargo, en este caso se puede realizar una comparación entre las mediciones a bajo y alto voltaje. En efecto, la fase de herida está formada por una secuencia de muchos ciclos de medición, y cada uno de ellos consiste en una medición a bajo voltaje seguida de una a alto voltaje. El tiempo que transcurre entre la última medición a bajo voltaje y la primera a alto voltaje en cada ciclo es aproximadamente 0,1 s, y la frecuencia de ambas mediciones es la misma, a saber, 50 kHz (Figura B.2.1). Por lo tanto, si se asume que el sistema sólo puede sufrir alteraciones despreciables durante este intervalo temporal, es posible comparar estos pares de valores de impedancia medidos a bajo y alto voltaje durante la fase de herida para obtener una correlación empírica a 50 kHz. Un resultado típico de este procesamiento se muestra en la Figura B.2.9 para un voltaje de herida de 1,2 V<sub>RMS</sub>. Las partes resistiva y capacitiva de la impedancia a ambas amplitudes de excitación (herida y control) se graficaron en función del tiempo en las Figuras B.2.9(a) y B.2.9(b), respectivamente.

La Figura B.2.9(c) muestra que el cociente entre los módulos de la impedancia a bajo y alto voltaje es proporcional al valor medido a bajo voltaje, y la misma correlación se encontró para los ángulos de fase (Figura B.2.9(d)). Estas correlaciones empíricas pueden ser expresadas como:

$$\frac{|Z_m|}{|Z_w|} = a_1 \cdot |Z_m| + b_1, \quad (\text{B.2.1})$$

$$\frac{\theta_m}{\theta_w} = a_2 \cdot \theta_m + b_2, \quad (\text{B.2.2})$$

donde  $|Z_m|$  y  $\theta_m$  representan el módulo y la fase de la impedancia medida a bajo voltaje, respectivamente, y  $|Z_w|$  y  $\theta_w$  representan los valores correspondientes a la impedancia medida a alto voltaje. Estas cantidades fueron calculadas a partir de las mediciones de resistencia y capacidad aplicando las siguientes relaciones, correspondientes a un circuito RC serie:

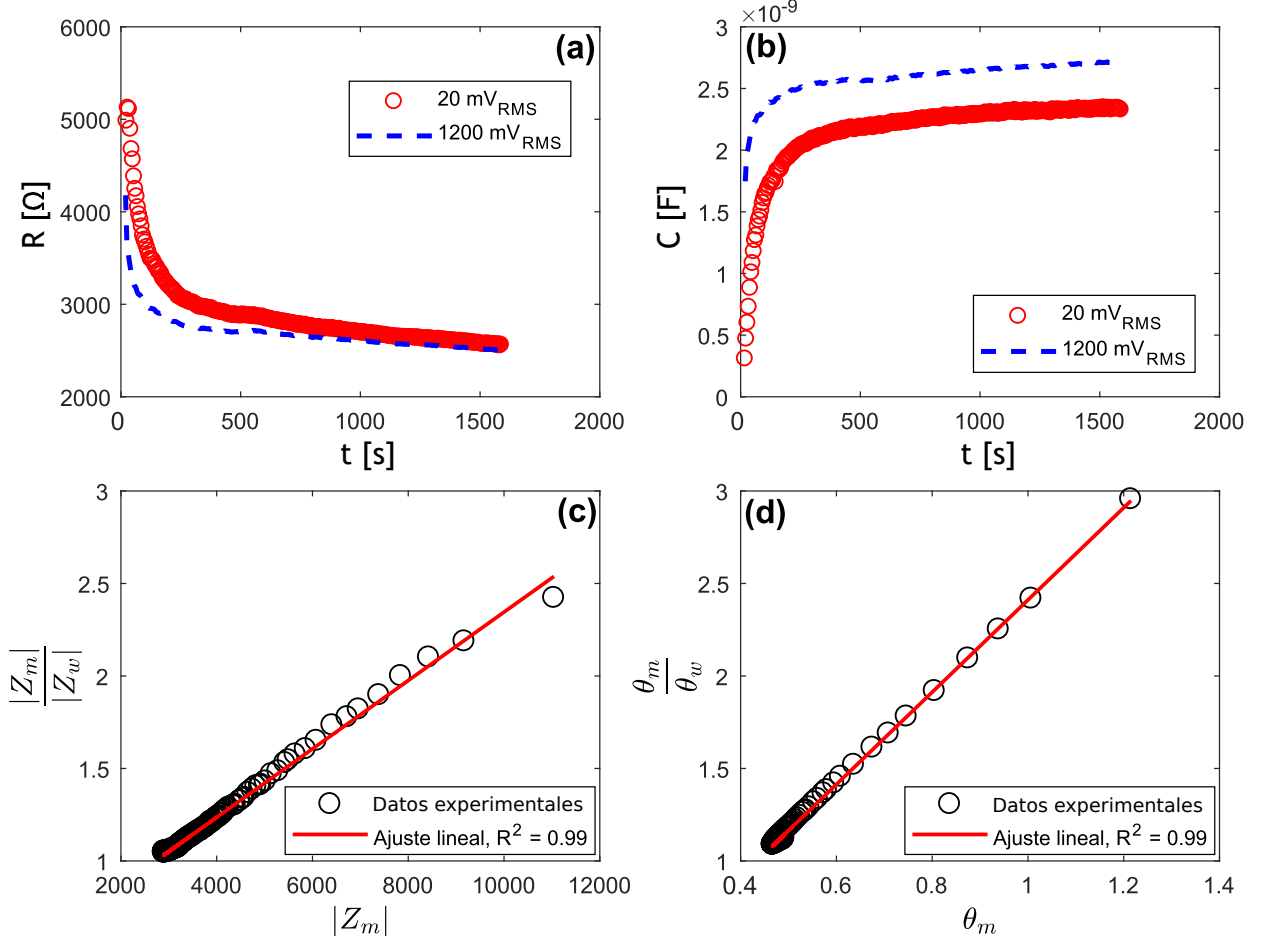
$$|Z_i| = \sqrt{R_i^2 + \left(\frac{1}{2\pi f C_i}\right)^2}, \quad (\text{B.2.3})$$

$$\theta_i = \tan^{-1} \left( \frac{1}{2\pi f R_i C_i} \right), \quad (\text{B.2.4})$$

donde  $R_i$  y  $C_i$  son los valores medidos de resistencia y capacidad en serie,  $f$  es la frecuencia de medición (50 kHz) y el subíndice  $i$  representa bajo o alto voltaje. Cabe aclarar que en lugar de utilizar los valores reales de ángulo de fase del circuito equivalente RC serie (que



son siempre negativos), se utilizó el valor absoluto de dicho ángulo en las ecuaciones B.2.2 y B.2.4. Esto se hizo deliberadamente con el objeto de obtener una línea con pendiente positiva en la Figura B.2.9(d), que resulta más sencilla de visualizar.



**Figura B.2.9:** Correlación empírica entre mediciones de impedancia a bajo y alto voltaje durante la fase de herida en un ensayo WH utilizando la segunda estrategia de medición. Las figuras (a) y (b) muestran la resistencia y la capacidad, respectivamente, en función del tiempo. Los círculos rojos representan los valores medidos a 20 mV<sub>RMS</sub> y las líneas azules cortadas indican los valores medidos a 1,2 V<sub>RMS</sub>. Las figuras (c) y (d) muestran las correlaciones empíricas entre los valores a alto y bajo voltaje del módulo y la fase de la impedancia, respectivamente.

El ajuste lineal fue realizado a 1,2 V<sub>RMS</sub> en 18 curvas de herida obtenidas de diferentes microelectrodos del mismo tamaño y geometría, todos los cuales mostraron un comportamiento similar. Para poder comparar los parámetros de estas correlaciones a ambos extremos del intervalo de amplitudes de la señal de herida, el experimento fue realizado también a 2 V<sub>RMS</sub> en 10 microelectrodos diferentes. Los resultados correspondientes a ambos voltajes se presentan en la Tabla B.2.1. Se observa que las pendientes de las rectas de correlación son mayores en las mediciones a 2 V<sub>RMS</sub>, lo que indicaría que los efectos no lineales son más importantes a mayores amplitudes de excitación.

**Tabla B.2.1:** Parámetros de las correlaciones dadas por las ecuaciones (B.2.1) y (B.2.2) para dos amplitudes diferentes de la señal de herida.

Amplitud [ $V_{\text{RMS}}$ ]	$a_1 \times 10^{-4}$ [ $\Omega^{-1}$ ]	$b_1$	$a_2$ [ $\text{rad}^{-1}$ ]	$b_2$
1,2	$1,8 \pm 0,6$	$0,49 \pm 0,11$	$2,0 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,2$
2,0	$3,0 \pm 0,4$	$0,28 \pm 0,10$	$2,9 \pm 0,18$	$-0,12 \pm 0,11$

Además del análisis de la correlación entre valores de impedancia a bajo y alto voltaje, existen otras cantidades relevantes que pueden ser obtenidas durante la fase de muerte celular a partir las mediciones logradas con esta técnica. Por ejemplo, es posible calcular las velocidades de cambio en la resistencia y en la capacidad, magnitudes que podrían brindar información útil en la discriminación celular. Un análisis más profundo de esto se lleva a cabo en la sección B.3.4.3.

## B.2.8. Conclusiones

Se utilizó un esquema alternativo de medición a alta velocidad para determinar espectros de impedancia eléctrica de microelectrodos desnudos y cubiertos con monocapas celulares, y los resultados son consistentes con aquellos obtenidos a menor velocidad con un sistema de medición ECIS estándar. Para las células MDCK, se determinó la aparición de efectos no lineales en las mediciones de impedancia a voltajes superiores a  $300 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  utilizando microelectrodos de  $250 \mu\text{m}$  de diámetro. Adicionalmente, se determinó la frontera entre amplitudes de excitación no invasivas y dañinas para esta línea celular, la cual se ubica aproximadamente a  $800 \text{ mV}_{\text{RMS}}$  (corrientes de aproximadamente  $0,1 \text{ mA}_{\text{RMS}}$ .)

Se introdujo una técnica de medición que combina mediciones a alto y bajo voltaje, permitiendo monitorear la variación temporal de los espectros de impedancia eléctrica durante la fase rápida de muerte celular en ensayos de herida y cicatrización. La duración característica de dicho régimen transitorio está en el orden de los 10 minutos para células MDCK con una señal de herida de  $1,2 \text{ V}_{\text{RMS}}$  y  $50 \text{ kHz}$ .

Se halló una correlación empírica entre las mediciones de impedancia a bajo y alto voltaje durante la fase de herida del ensayo, y los parámetros de dicha correlación fueron calculados para dos amplitudes de excitación diferentes. Se determinó que los efectos no lineales en la relación entre el voltaje aplicado y la corriente resultante aumentan con la amplitud de excitación.

La técnica desarrollada en este capítulo puede ser utilizada para estudiar el comportamiento dinámico de células normales y transformadas durante la fase de muerte celular. De esta manera, es posible analizar si existen diferencias significativas que puedan utilizarse a fines de lograr una discriminación entre ambos tipos celulares, lo que constituye el principal

objetivo de esta tesis. En efecto, las aplicaciones inmediatas de esta técnica se presentan en la Sección [B.3.4.3](#).

Como reflexión final, la técnica aquí desarrollada podría utilizarse también para realizar un análisis más profundo de las no linealidades presentes en las mediciones de impedancia eléctrica de electrodos cubiertos con células.

## Capítulo B.3

# Discriminación entre células normales y cancerosas

### B.3.1. Resumen

En las últimas dos décadas, la espectroscopia de impedancia eléctrica ha sido utilizada como herramienta de análisis en estudios que involucran células normales y cancerosas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Muchos de estos estudios centraron sus esfuerzos en el análisis de aspectos biológicos del cáncer, con el objetivo de lograr una mayor comprensión de su funcionamiento, mientras que unos pocos propusieron utilizar mediciones de impedancia espectral para discriminar células normales de cancerosas e incluso realizar un diagnóstico de patologías oncológicas. Los trabajos publicados hasta el momento son muy diversos en cuanto a los aspectos que analizan y a las posibles aplicaciones que proponen. No obstante, aún no se ha reportado una metodología de trabajo unificada que permita, a partir de una muestra desconocida, evaluar si proviene de un tejido sano o canceroso mediante un análisis combinado de diferentes técnicas de medición de impedancia eléctrica. En este capítulo se desarrolló, en primer lugar, un protocolo de medición *in vitro* que permite determinar ciertas características relevantes de cultivos celulares a partir de mediciones de impedancia eléctrica. Las mediciones se dividieron en cuatro fases diferentes, cada una de las cuales corresponde a un estado particular del cultivo celular. En cada una de estas fases se obtuvieron diferentes parámetros característicos, y con ellos se construyeron vectores de características de 26 dimensiones. Luego, se realizó un análisis de discriminante lineal (LDA) y toda la información dada por las mediciones de impedancia eléctrica se combinó en un único número real que puede ser utilizado como indicador en el diagnóstico de cáncer. Los resultados presentaron un bajo porcentaje de determinaciones incorrectas.

Los contenidos principales de este capítulo se detallan a continuación:

- En la Sección [B.3.2](#) se da una reseña histórica de la aplicación de mediciones de impedancia eléctrica en el estudio del cáncer.

- En la Sección [B.3.3](#) se describen los diferentes tipos de mediciones realizadas en esta tesis en pos de discriminar entre cultivos celulares normales y cancerosos a partir de un conjunto de parámetros característicos, y se desarrolla un protocolo de medición que permite obtener esta información de manera sistemática.
- En la Sección [B.3.4](#) se presentan los resultados experimentales obtenidos para cada fase de medición según el protocolo desarrollado en la Sección [B.3.3](#). Se describen también los modelos de ajuste utilizados en cada caso para la extracción, a partir de estos datos, de los parámetros característicos en cada fase.
- En la Sección [B.3.5](#) se desarrolla una técnica de discriminación entre células normales y cancerosas a partir de los resultados obtenidos en los experimentos. La Sección [B.3.5.1](#) se ocupa de realizar una reducción de la dimensión del problema mediante la selección de los parámetros característicos más relevantes. En la Sección [B.3.5.2](#) se implementa el análisis de discriminante lineal (LDA) en los datos resultantes y se define una frontera de discriminación.

## B.3.2. Introducción

Resulta de interés desarrollar un ensayo automático que permita discriminar entre células normales y cancerosas con el objeto de obtener un indicador que pueda ser empleado en el proceso de diagnóstico de cáncer (Sección [A.1.4](#)). Uno de los primeros experimentos realizados por Giaever y Keese con la técnica ECIS involucró el análisis del comportamiento de células normales y cancerosas bajo la influencia de un potencial eléctrico alterno de frecuencia fija [\[9\]](#). Las líneas celulares analizadas fueron la WI-38 (normal) y la WI-38/VA13 (cancerosa), ambas correspondientes a fibroblastos de mamíferos. En ese estudio, los autores observaron, entre otras cosas, que las señales medidas en electrodos cubiertos con células cancerosas presentaban fluctuaciones de mayor amplitud que las correspondientes a células normales, y este comportamiento fue confirmado en un estudio posterior [\[10\]](#). Dichas fluctuaciones fueron analizadas en detalle por los mismos autores unos años después [\[27\]](#) y el proceso que las origina fue llamado *micromotion* (Sección [A.2.4](#)). En el último trabajo mencionado, los autores midieron también espectros de resistencia y capacidad de ambos tipos celulares, y desarrollaron un modelo teórico que relaciona tres parámetros biológicos con las señales obtenidas (Sección [A.2.3](#)). Los resultados reportados muestran claras diferencias entre los valores obtenidos para células normales y cancerosas, tanto en los espectros de impedancia como en los parámetros biológicos derivados de ellos mediante el modelo teórico. Sin embargo, estas diferencias no fueron analizadas con mayor profundidad en trabajos posteriores, y dichos resultados se utilizaron principalmente para demostrar la utilidad potencial de la técnica ECIS como medio para estudiar diferentes aspectos de cultivos celulares *in vitro*.

Luego de una etapa de prueba en la que se realizaron muchos experimentos para evaluar su utilidad, la técnica ECIS empezó a ser implementada en diferentes aplicaciones que involucran el estudio de propiedades de cultivos celulares *in vitro*. El estudio del cáncer no fue una excepción, y varios trabajos fueron publicados al respecto. La mayoría de estos trabajos se enfocaron en el estudio del comportamiento de células cancerosas en condiciones específicas y tuvieron como objeto lograr una mejor comprensión de los distintos aspectos involucrados tanto en el desarrollo de esta enfermedad como en métodos para combatirla [50–55]. Sin embargo, muy pocos trabajos han sido reportados en los que se evalúa la posibilidad de utilizar mediciones de impedancia eléctrica para realizar una discriminación entre células normales y cancerosas, con vistas a una posible aplicación en el diagnóstico clínico. En uno de los primeros trabajos realizados en este contexto, se efectuaron mediciones de impedancia sobre tejidos normales y tumorales *in vivo* y los resultados mostraron ciertas diferencias entre ambos, las cuales fueron atribuidas al contenido de agua de las células y a la capacidad eléctrica de las membranas celulares [56]. En otro estudio se reportaron diferencias entre tejidos normales y cancerosos que fueron asociadas a la formación de los arreglos celulares (es decir, la manera en que se forman las capas de células) y al tamaño de los núcleos celulares [34]. En la Sección A.2.6 se describieron en mayor detalle otros trabajos realizados en este contexto.

En este capítulo, se propone en primer lugar definir, para una línea celular dada, un conjunto de parámetros característicos que resulte representativo de la misma y que se obtenga a partir mediciones de impedancia eléctrica. Siguiendo esta idea, es teóricamente posible lograr una discriminación entre una línea celular normal y otra cancerosa mediante un correcto análisis estadístico de sus parámetros característicos. Esta es la base de muchos algoritmos de clasificación y particularmente del *análisis de discriminante lineal* (LDA, por sus siglas en inglés). En el LDA, se construye un vector de características (*feature vector*)  $\theta$ , cuyas coordenadas representan los valores de cada parámetro característico en un espacio multidimensional. Mediante la realización de experimentos basados en mediciones de impedancia eléctrica, es posible determinar todos los parámetros característicos en un cultivo celular dado y obtener así una muestra de  $\theta$  asociada a la población correspondiente (de células normales o cancerosas). A partir de estas mediciones, se puede formar una base de datos con valores de  $\theta$  para cada población, obteniéndose lo que se conoce como conjunto de entrenamiento (*training set*). Finalmente, la clasificación de una muestra desconocida se efectúa mediante su comparación con ambos conjuntos de entrenamiento.

## B.3.3. Materiales y métodos

### B.3.3.1. Cultivos celulares

A lo largo de este capítulo se presentan experimentos que involucraron las líneas celulares NMuMG (Sección B.1.2.3) (números de pasaje 7 - 12) y LM3 (Sección B.1.2.4) (números de pasaje 8 - 14). Los medios de cultivo utilizados se detallan en la Sección B.1.3.1, y para estos experimentos se realizó un pretratamiento de las superficies de cultivo con L-cisteína, tal como se indica en la Sección B.1.3.3. El medio de cultivo fue renovado cada 12 horas, y en cada cambio se pausaron las mediciones por un tiempo total de 30 minutos, con el objeto de permitir la estabilización térmica del medio de cultivo dentro de los *wells*. En el desarrollo que se expone a continuación, se utilizan los términos “normales” haciendo referencia a las células NMuMG y “cancerosas” en referencia a las células LM3.

### B.3.3.2. Protocolo de medición

Para poder desarrollar un método de discriminación a partir de mediciones de impedancia eléctrica, se debe determinar previamente un conjunto de parámetros característicos que permitan diferenciar células normales de cancerosas. Es necesario entonces evaluar en primer lugar el comportamiento eléctrico de ambas líneas celulares. La información que puede obtenerse mediante la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica celular depende del tipo de medición realizada y del estado de la capa celular al momento de la medición. La secuencia de estados que sigue a la inoculación de células sobre un microelectrodo desnudo, junto con algunas consideraciones e hipótesis, se describe a continuación:

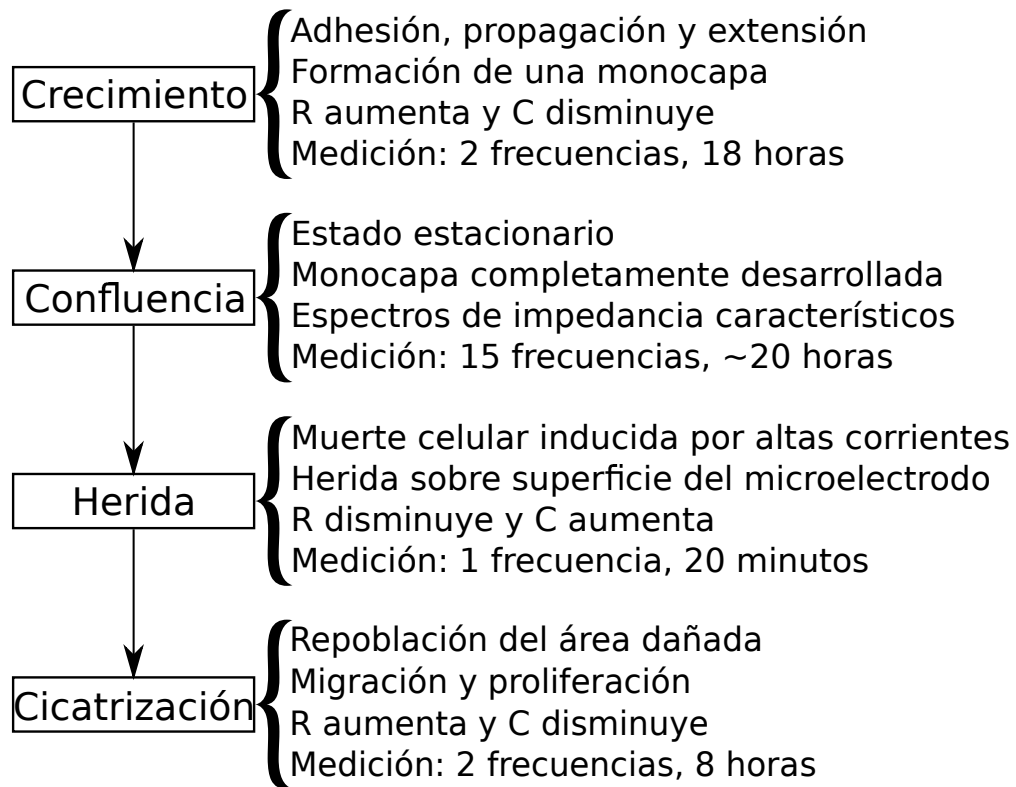
1. En primer lugar, la impedancia del sistema aumenta (la resistencia equivalente se incrementa y la capacidad equivalente disminuye) a medida que las células se adhieren al sustrato, migran y se extienden hasta cubrir completamente la superficie del microelectrodo [9, 10]. Llamaremos a este estado transitorio “fase de crecimiento” y la simbolizaremos con la letra **G**. Resultados previos han mostrado que las células cancerosas tienden a adherirse y propagarse de forma desorganizada y consecuentemente más lenta que las normales [10], a la vez que presentan un crecimiento más extenso y descontrolado [57]. Es esperable que estas diferencias se vean reflejadas en la dinámica de la fase de crecimiento, y por lo tanto resulta de interés analizar el comportamiento de ambas líneas celulares a lo largo de la misma. En base a estudios preliminares (no reportados aquí), diseñamos estas mediciones con una duración de 18 horas, de forma tal de poder asegurar la captura completa de la dinámica de la fase de crecimiento.
2. Una vez que las células cubren completamente la superficie disponible, forman una monocapa confluyente y el sistema alcanza un estado en el cual sólo se observan fluctuaciones en los valores de impedancia con amplitud relativamente baja y corta duración

(*micromotion*, Sección A.2.4). Llamaremos a este estado estacionario “fase de confluencia” y lo simbolizaremos con la letra **C**. En esta fase, las mediciones de espectros de impedancia brindan información relevante que refleja aspectos biológicos de las células, como se explica más detalladamente en la Sección B.3.4.2. Las señales de *micromotion*, de naturaleza estocástica, han sido analizadas en profundidad en un trabajo anterior [21] y no fueron consideradas en este estudio.

3. Durante la fase de confluencia, la monocapa celular puede ser dañada deliberadamente mediante la aplicación de una señal de amplitud elevada para llevar a cabo un ensayo de herida y cicatrización (Capítulo B.2). Durante la aplicación de la señal de herida, la impedancia del sistema a lo largo del espectro disminuye tendiendo al valor correspondiente al electrodo desnudo. Realizado de manera adecuada, este tipo de ensayo puede proporcionar información acerca de la dinámica del régimen transitorio que corresponde al proceso de muerte celular (Sección B.2.7). Llamaremos a esta parte del ensayo “fase de herida” y la simbolizaremos con la letra **W**.
4. Finalmente, luego de cesar la aplicación de la señal de herida sobre la monocapa celular, las células vivas que rodean la zona dañada tienden a desplazarse y reproducirse hasta recubrir nuevamente el área abarcada por la herida, incrementando la impedancia del sistema. Es de esperar que ambas líneas celulares se comporten de manera diferente durante esta “fase de cicatrización” (simbolizada con la letra **H**) debido al crecimiento descontrolado de las células cancerosas.

La Figura B.3.1 resume el protocolo de medición desarrollado y utilizado en este trabajo.





**Figura B.3.1:** Protocolo de medición para la discriminación entre células normales y cancerosas. Cada fase se caracteriza por un comportamiento específico del cultivo celular y se adoptan diferentes esquemas de medición en cada una de ellas.

### B.3.3.3. Esquemas de medición

Todas las mediciones no invasivas realizadas en este capítulo se llevaron a cabo empleando el sistema de medición ECIS estándar (Sección B.1.1.2). Se utilizaron microelectrodos comerciales de Au con diámetro equivalente de 250  $\mu\text{m}$  contenidos en un dispositivo MW2 (Sección B.1.1.1). Este esquema se usó para mediciones en microelectrodos desnudos y cubiertos durante las fases de crecimiento, confluencia y cicatrización. Las mediciones espectrales se llevaron a cabo a 15 frecuencias diferentes entre 20 Hz y 100 kHz, separadas logarítmicamente.

Las mediciones de impedancia durante la fase de herida del ensayo se realizaron utilizando un procedimiento similar al desarrollado en el Capítulo B.2, con algunas modificaciones. Las amplitudes de las señales de herida y control fueron de 2  $V_{\text{RMS}}$  y 20  $\text{mV}_{\text{RMS}}$ , respectivamente, y la frecuencia fue de 30 kHz en ambos casos. Un ciclo de herida consistió en mediciones sucesivas a alto y bajo voltaje hasta que el microelectrodo fue expuesto a la señal de herida por un tiempo total de 60 segundos. Transcurrido este tiempo, se seleccionó el siguiente microelectrodo por medio del circuito demultiplexor y se inició un nuevo ciclo. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un total de 20 ciclos para cada microelectrodo, resultando en un tiempo efectivo de herida de 20 minutos. El objetivo de este ensayo en cascada fue lograr que todos los microelectrodos se encuentren aproximadamente en las mismas

condiciones antes de iniciar la fase de cicatrización.

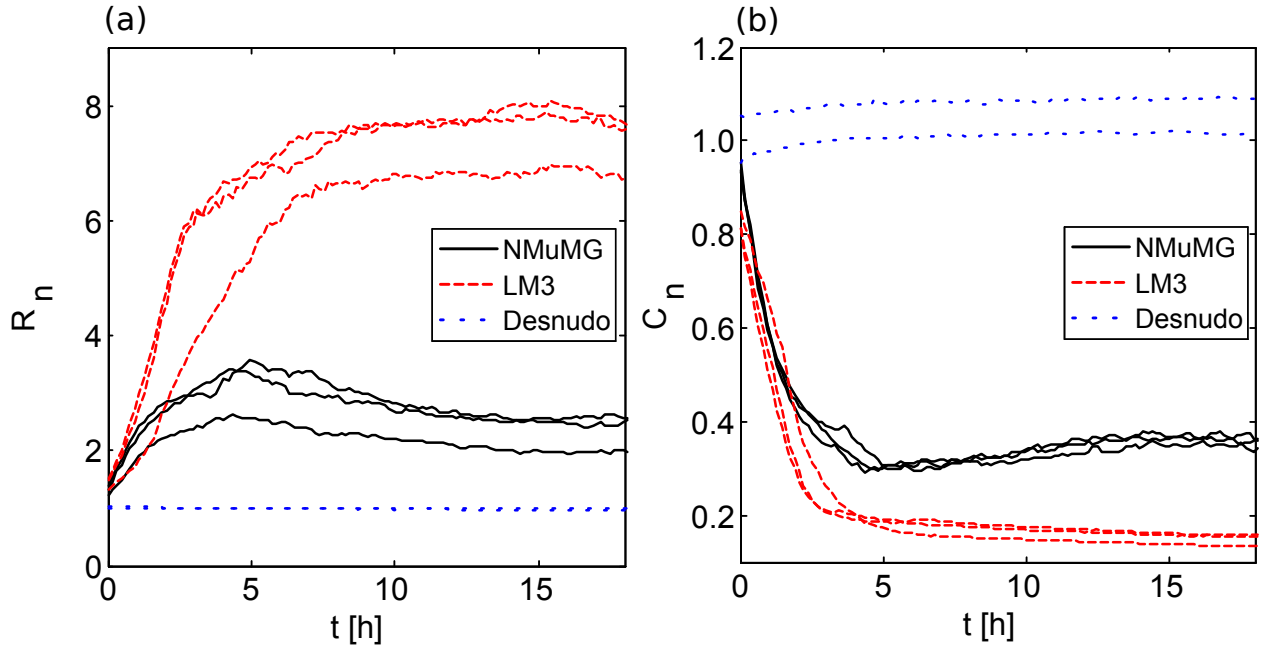
## B.3.4. Resultados experimentales

### B.3.4.1. Fase de crecimiento

En cada experimento, se midió un espectro de impedancia de los microelectrodos desnudos inmediatamente antes de la inoculación de células en los *wells*. Las Figuras B.3.2(a) y B.3.2(b) muestran la variación temporal de la resistencia y capacidad normalizadas, respectivamente, para 8 *wells* diferentes durante la fase de crecimiento en un experimento típico. Nótese que tanto la resistencia como la capacidad normalizadas son cantidades adimensionales. Tres de estos *wells* fueron sembrados con células NMuMG y tres con células LM3, mientras que los dos restantes se mantuvieron desnudos durante todo el experimento. Para las mediciones de resistencia se utilizó una frecuencia fija de 4775 Hz. Experimentos preliminares mostraron que a esta frecuencia la diferencia entre la resistencia eléctrica de los microelectrodos cubiertos y desnudos es significativa para ambas líneas celulares. Como se verá en la Sección B.3.4.2, las células LM3 tienen una respuesta máxima a una frecuencia algo menor y las NMuMG a una frecuencia algo mayor, y por lo tanto el valor seleccionado es el resultado de una relación de compromiso entre estas cantidades. No obstante, a esta frecuencia las mediciones son sensibles para ambas líneas celulares ( $R_n$  es mayor que 1 y cercano al máximo en la fase de confluencia, ver Figura B.3.3), y al mismo tiempo existe una gran diferencia entre ambos valores de resistencia normalizada, con lo cual esta información resulta útil para discriminar entre células normales y cancerosas. El mismo criterio se utilizó para seleccionar una frecuencia de 100 kHz en las mediciones de capacidad durante esta fase. Cabe aclarar que todas las mediciones involucraron determinaciones de resistencia y capacidad, pero sólo se extrajo información de la resistencia a 4775 Hz y de la capacidad a 100 kHz durante esta fase.

Los resultados muestran que ambas líneas celulares incrementan la impedancia del sistema hasta alcanzar un estado estacionario en un tiempo de aproximadamente 13 horas para las NMuMG y 15 horas para las LM3. Estos valores corresponden al experimento de la figura, pero se han obtenido valores algo menores y algo mayores en otros experimentos. Dicho tiempo resultó, no obstante, siempre ligeramente mayor en las células LM3, y esta diferencia también fue observada previamente en otras líneas normales y cancerosas [10]. Además, las células cancerosas alcanzan en el estacionario valores de resistencia mucho más elevados (y valores de capacidad menores) que las normales, comportamiento que fue observado en todos los experimentos realizados en este trabajo. Otra característica que puede apreciarse en estas curvas es que las células normales presentan una resistencia normalizada máxima aproximadamente 5 horas luego de la inoculación, tras lo cual los valores disminuyen un poco hasta alcanzar finalmente el estado estacionario. Este fenómeno, al que llamaremos “pico de

resistencia”, fue observado en un trabajo previo [10] con otras líneas celulares normales, y se adjudicó al hecho de que las mismas se adhieren a la superficie de cultivo muy firmemente en un principio, pero luego se relajan un poco y comienzan a exhibir movilidad. Las células cancerosas, en cambio, tienen dificultades para adherirse y propagarse de forma organizada, y por eso no alcanzan el mismo grado de firmeza inicial y la posterior relajación. No obstante, una vez adheridas, las células cancerosas presentan valores más elevados de impedancia, como se explica en la Sección B.3.4.2.



**Figura B.3.2:** Curvas de crecimiento típicas para células normales (líneas sólidas negras) y cancerosas (líneas cortadas rojas). Las líneas punteadas representan microelectrodos desnudos (control). A  $t = 0$ , las células fueron inoculadas en diferentes *wells* con medio de cultivo y se registró la impedancia a 4775 Hz (curvas de resistencia) y 100 kHz (curvas de capacidad). Los cambios en la resistencia (a) y la capacidad (b) debidos a la adhesión y extensión de las células son similares para ambos tipos celulares durante las primeras 2 horas. Luego, la tasa de cambio de impedancia para las células normales tiende a disminuir, mientras que para las cancerosas dicha tasa se mantiene relativamente constante por otras 2-3 horas. La fase estacionaria es alcanzada aproximadamente a las 13 horas para células normales y 15 horas para las cancerosas.

En la búsqueda de parámetros característicos de ambas líneas celulares durante esta fase, siguiendo lo descrito en el párrafo anterior se propuso en primer lugar analizar la presencia o ausencia del pico de resistencia normalizada durante las primeras 15 horas de medición. Para ello, se programó e implementó un algoritmo de detección de dichos picos en las curvas de la Figura B.3.2 y se definió el parámetro  $R_p$ , al cual se le asignó el valor 1 si el pico estaba presente, y 0 en caso contrario. Además, se determinó en cada caso el tiempo  $t_p$  (en horas) en el cual ocurre el pico y, en caso de no existir, se le asignó el valor máximo de la ventana temporal ( $t_p = 15$  h).

En un trabajo realizado por Wegener et al. [13], se definieron dos parámetros que describen el fenómeno de adhesión y propagación de células sobre microelectrodos. Uno de estos

parámetros es el tiempo medio  $t_{1/2}$ , que se define como el tiempo requerido para que las células se propaguen sobre la mitad de la superficie disponible. Para poder determinar el valor de capacidad correspondiente a un 50 % de superficie cubierta, los autores realizaron una simulación aplicando el modelo de Giaever y Keese (Sección A.2.3), para lo cual utilizaron ciertos datos característicos de las células, tales como el radio celular, la distancia entre la membrana basal y el microelectrodo, y la capacidad eléctrica de la membrana celular. Dichos datos fueron obtenidos con otros métodos y se encontraban disponibles en la bibliografía, ya que en el trabajo mencionado se analizó el comportamiento de la muy estudiada línea celular MDCK. En esta tesis, sin embargo, se analizan dos líneas celulares diferentes, y los datos necesarios para realizar dicha simulación no se encuentran disponibles aún en la bibliografía. Debido a ello, se decidió utilizar un parámetro diferente a  $t_{1/2}$  pero basado en el mismo tipo de información. Se definió entonces el parámetro  $t_G$  como el tiempo en horas requerido para que la curva de capacidad normalizada cruce el valor umbral  $C_n = 0,4$ , el cual fue adoptado en función de las características de las curvas de crecimiento.

El segundo parámetro descrito en el trabajo de Wegener et al. es la pendiente media del cambio de capacidad,  $s_C$ , que representa la tasa aparente de propagación celular y está dado en  $[h^{-1}]$ . Dicho valor fue calculado a partir de la pendiente de un ajuste lineal realizado entre los valores representativos  $C_n = 0,5$  y  $C_n = 0,3$ . La ecuación que relaciona las variables mencionadas es:

$$C_n = -s_C \cdot t + b_C, \quad (\text{B.3.1})$$

donde  $t$  representa el tiempo y  $b_C$  es la ordenada al origen de la recta. Nótese que  $s_C$  aparece con un signo negativo en la ecuación, ya que simboliza la tasa a la cual las células se propagan sobre el microelectrodo y por lo tanto sus valores son siempre positivos (mientras que la pendiente de la recta es siempre negativa). El ajuste lineal se realizó empleando el método de los mínimos cuadrados.

Cuatro parámetros característicos diferentes se obtuvieron entonces a partir de los cambios de impedancia durante la fase de crecimiento, y por lo tanto están asociados a la velocidad de desarrollo de las monocapas confluentes correspondientes a ambos tipos celulares. Estos parámetros son el pico de resistencia  $R_p$  y su tiempo de ocurrencia  $t_p$ , el tiempo característico de propagación celular  $t_G$  y la tasa aparente de propagación celular  $s_C$ .

### B.3.4.2. Fase de confluencia

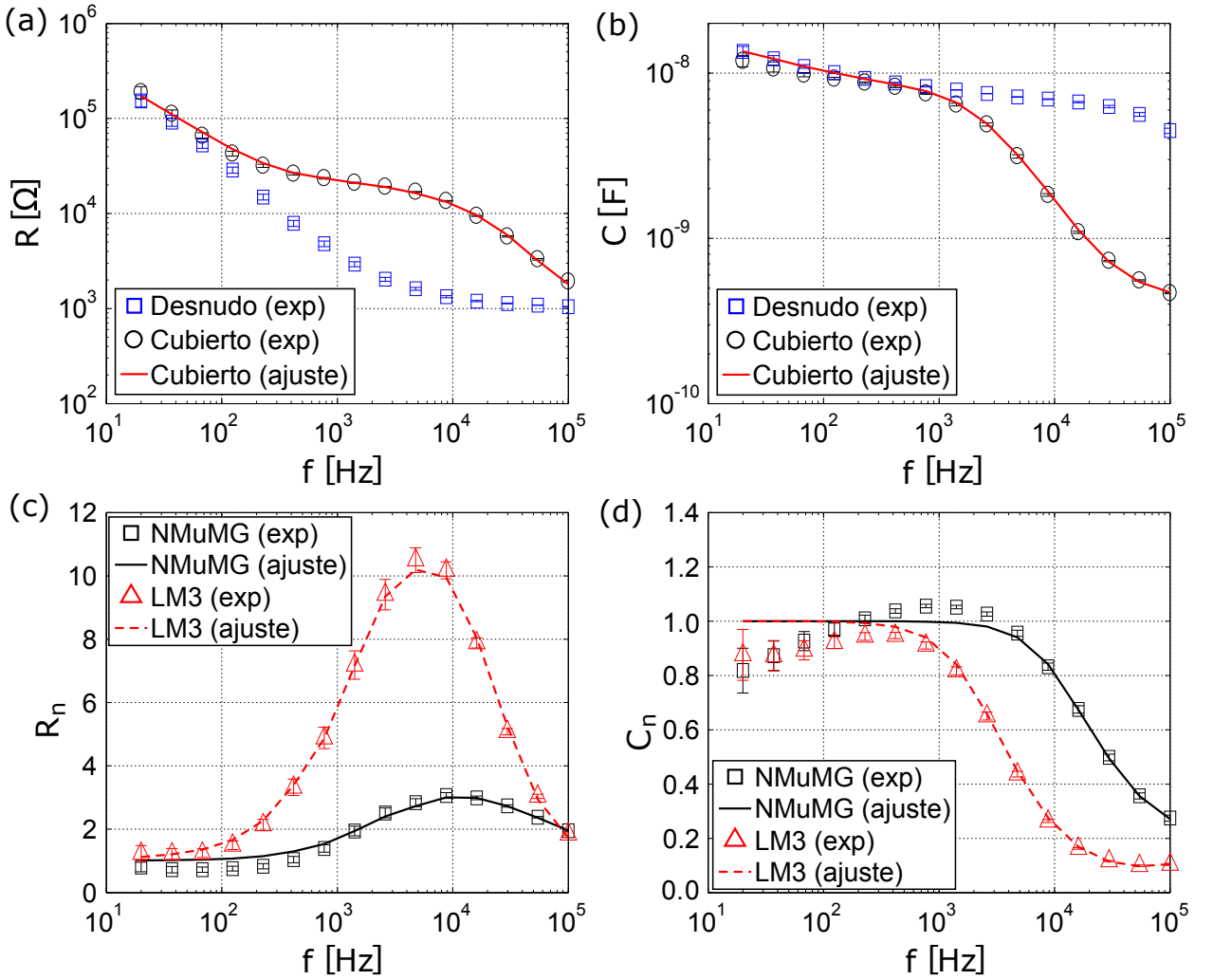
La fase de confluencia comienza cuando las señales de impedancia alcanzan un estado estacionario, lo que ocurre normalmente entre 10 y 15 horas luego de la inoculación para las líneas celulares estudiadas. Estos valores fueron determinados en 6 cultivos celulares diferentes utilizando el método descrito en el Apéndice III. Por lo tanto, una fase de crecimiento de 18 horas demostró ser suficiente para asegurar que los cultivos alcancen el estado estacionario en todos los experimentos realizados en este trabajo. Espectros típicos de cultivos norma-

les y cancerosos en la fase de confluencia se presentan en la Figura B.3.3. Los resultados muestran valores de resistencia significativamente más altos (en frecuencias intermedias del espectro) y valores de capacidad mucho menores (en frecuencias elevadas) para las células LM3 que para las NMuMG. Esto podría deberse a que las células cancerosas se adhieren más fuertemente al sustrato y/o entre sí (formando *tight junctions* más fuertes), ya que ambas razones implicarían un incremento mayor en la impedancia del sistema, si bien la segunda es más influyente [11]. Otra explicación posible es que las células cancerosas se superponen parcialmente formando multicapas, las cuales poseen una impedancia mayor a la de una monocapa.

Durante esta fase, se midieron entre 25 y 30 espectros de impedancia a una tasa de aproximadamente un espectro cada 40 minutos con el objeto de monitorear las fluctuaciones a largo plazo de las propiedades eléctricas de las monocapas confluentes. A partir de cada conjunto de mediciones, se determinaron los siguientes parámetros característicos:

1. Resistencia normalizada máxima promedio,  $R_n$ .
2. Promedio del logaritmo de la frecuencia a la que ocurre la resistencia normalizada máxima,  $L_f$ .
3. Capacidad normalizada mínima promedio,  $C_n$ .
4. Desvío estándar de la resistencia normalizada máxima,  $\sigma_R$ .
5. Desvío estándar de la capacidad normalizada mínima,  $\sigma_C$ .

Nótese que todas las cantidades listadas anteriormente son adimensionales. Para cada curva de resistencia normalizada, se determinó en primer lugar el punto correspondiente al máximo y luego se realizó un ajuste cuadrático empleando dicho punto y los dos adyacentes. A partir de este ajuste, se determinó el vértice de la parábola y de él se extrajeron los valores de  $R_n$  y  $L_f$ . El parámetro  $L_f$  es el logaritmo natural de la frecuencia  $f$  (medida en Hz), y se utilizó en lugar de ésta debido a que los valores de frecuencia utilizados para las mediciones están equiespaciados logarítmicamente (Sección B.3.3.3), y por lo tanto el ajuste de las curvas de resistencia normalizada mediante parábolas (cerca de su máximo) es bueno únicamente cuando la frecuencia está en escala logarítmica.



**Figura B.3.3:** Espectros de impedancia durante la fase de confluencia. Las figuras (a) y (b) muestran la resistencia y la capacidad, respectivamente, de un microelectrodo desnudo (cuadrados azules) y uno cubierto con células LM3 (círculos negros). También se graficaron la resistencia normalizada (c) y la capacidad normalizada (d) tanto para las células normales (cuadrados negros) como para las cancerosas (triángulos rojos) durante esta fase. Los valores experimentales fueron ajustados con el modelo de Giaever y Keese (ecuaciones A.2.3a - A.2.3c) y los espectros teóricos de resistencia y capacidad resultantes del ajuste se graficaron como líneas llenas negras para las células normales y líneas cortadas rojas para las cancerosas. Las barras de error representan el desvío estándar.

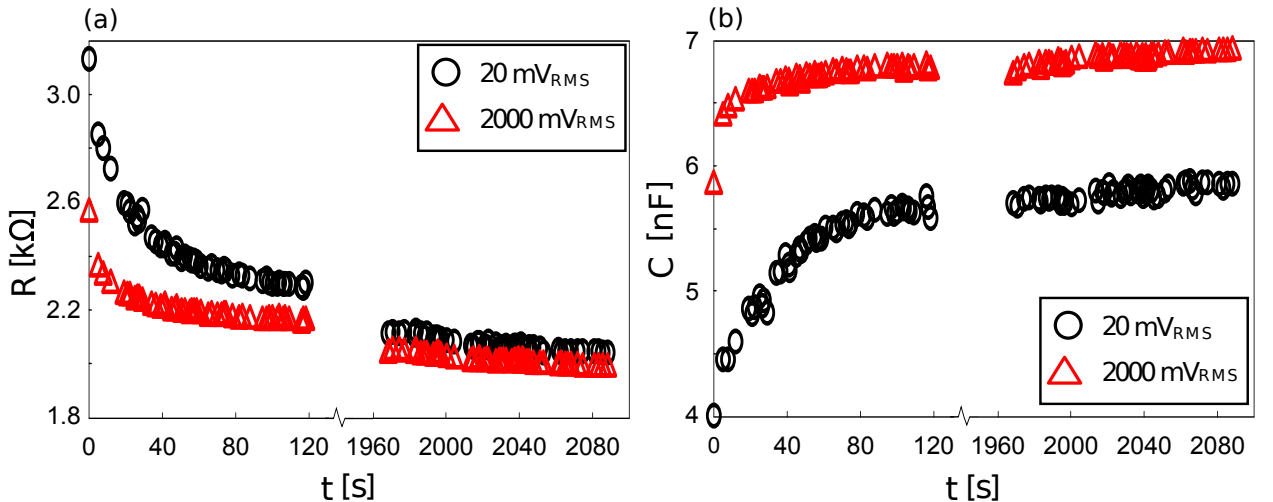
Como se mencionó en la Sección A.2.3, existen diferentes modelos matemáticos que describen la relación entre los espectros de impedancia durante la fase de confluencia y algunos aspectos biológicos de los cultivos celulares. El más simple y más utilizado de estos modelos es el de Giaever y Keese [27], representado por las ecuaciones (A.2.3). Dicho modelo describe la relación entre las impedancias específicas de un electrodos cubierto ( $Z_{cov}$ ) y el respectivo electrodos desnudo ( $Z_{nak}$ ). Posee tres parámetros de relevancia biológica, a saber: (1) el parámetro de constricción  $\alpha$  (dado en [ $\Omega^{1/2} \cdot \text{cm}$ ]), que depende del radio celular y de la separación entre la superficie del electrodos y la capa celular, (2) la función de barrera  $R_b$  (dada en [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]), que mide la resistencia eléctrica entre células adyacentes y (3) la capacidad eléctrica específica de la membrana celular (considerando conjuntamente las membranas

basal y apical)  $C_m$  (dada en  $[\mu\text{F}/\text{cm}^2]$ ). Con los datos obtenidos en la fase de confluencia, se determinaron los valores de estos tres parámetros ajustando cada espectro de impedancia al modelo de Giaever y Keese y promediando sobre el conjunto total de datos. El ajuste se realizó según el procedimiento descrito en el Apéndice II. Por lo tanto, en esta fase de medición se determinaron en total 8 parámetros característicos ( $R_n$ ,  $L_f$ ,  $C_n$ ,  $\sigma_R$ ,  $\sigma_C$ ,  $\alpha$ ,  $R_b$  y  $C_m$ ).

### B.3.4.3. Fase de herida

Los ensayos de herida y cicatrización realizados sobre monocapas celulares confluentes están típicamente destinados a monitorear la migración y proliferación celular luego de efectuar un daño mecánico o eléctrico deliberado sobre una porción específica de las mismas. En el Capítulo B.2 se desarrolló una técnica que permite estudiar la dinámica de la fase de herida, es decir, los cambios que se producen en el intervalo de tiempo en que la herida se está desarrollando. Un ensayo similar se empleó para estudiar los cambios de impedancia durante la fase de herida en este capítulo. Dos señales se utilizaron para este propósito, a saber, una señal de herida cuya amplitud fue de  $2 V_{\text{RMS}}$  y una señal de control con una amplitud de  $20 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ . Los detalles de la medición se dieron en la Sección B.3.3.2.

La Figura B.3.4 muestra la evolución temporal de la resistencia y la capacidad medidas durante la fase de herida en un cultivo de células LM3 utilizando este protocolo. Como se esperaba, se observa una caída en los valores de resistencia y un correspondiente aumento en la capacidad como consecuencia del daño inducido en la monocapa celular por la aplicación de la señal de herida.



**Figura B.3.4:** Resistencia (a) y capacidad (b) en función del tiempo durante la fase de herida en un cultivo de células LM3. Los círculos negros y los triángulos rojos representan mediciones a bajo y alto voltaje, respectivamente. Cada conjunto de puntos adyacentes representa un ciclo de herida, como se describe en el texto. Para mayor claridad, sólo se muestran los ciclos número 1 y 3.

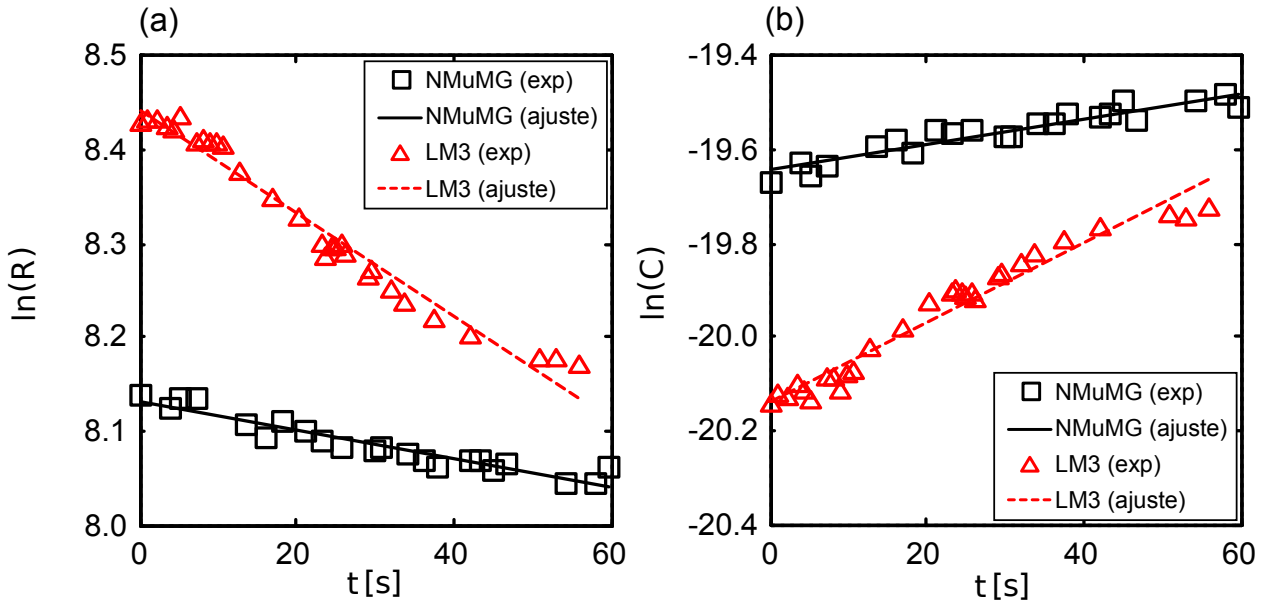
Los resultados muestran que la mayoría de los cambios de impedancia ocurren durante el

primer ciclo de herida, y este comportamiento se observó en todos los experimentos realizados. Los cambios de resistencia y capacidad durante este ciclo siguen trayectorias de forma exponencial, como se muestra en las Figuras B.3.5(a) y B.3.5(b), donde se graficaron ambas magnitudes en escala logarítmica. Se realizó un ajuste lineal sobre estas curvas utilizando los siguientes modelos:

$$\ln(R) = a_R \cdot t + b_R, \quad (\text{B.3.2})$$

$$\ln(C) = a_C \cdot t + b_C. \quad (\text{B.3.3})$$

Antes de calcular el logaritmo natural,  $R$  estaba dada en  $[\Omega]$  y  $C$  en  $[F]$ . Las pendientes de estas ecuaciones están dadas en  $[s^{-1}]$  y miden la tasa aparente de herida (es decir, la “rapidez” con que se desarrolla la herida), mientras que las ordenadas al origen (adimensionales) están asociadas a los valores de  $R$  y  $C$  a 30 kHz antes de aplicar la señal de herida, y dependen de la distancia célula-sustrato, de la resistencia entre células adyacentes y de la capacidad de la membrana celular. Estas cuatro magnitudes se incluyeron en el conjunto de parámetros característicos. En la Figura B.3.5 se muestra un ejemplo de este ajuste para un cultivo de células normales y uno de cancerosas.



**Figura B.3.5:** Logaritmo natural de la resistencia (a) y capacidad (b) en función del tiempo durante el primer ciclo de herida para células NMuMG y LM3. Los valores mostrados corresponden a la señal de control (20 mV<sub>RMS</sub>). Las células normales se representan con cuadrados negros y líneas llenas, mientras que los triángulos rojos y las líneas cortadas corresponden a células cancerosas. Los ajustes lineales se realizaron utilizando las ecuaciones B.3.2 y B.3.3.

Los resultados obtenidos en el capítulo B.2 mostraron que los valores medidos de impedancia cambian a medida que se incrementa el voltaje de excitación por encima de un valor



límite [58] (Sección B.2.5). En el presente capítulo, las relaciones entre los valores medidos de impedancia compleja a ambos voltajes se modelaron con las ecuaciones (B.3.4) y (B.3.5), que son ligeramente diferentes a las utilizadas en el análisis del capítulo B.2<sup>1</sup>:

$$\frac{1}{|Z_w|} = a_1 \cdot \frac{1}{|Z_m|} + b_1, \quad (\text{B.3.4})$$

$$\frac{1}{\theta_w} = a_2 \cdot \frac{1}{\theta_m} + b_2. \quad (\text{B.3.5})$$

La ecuación (B.3.4) describe una relación empírica entre los módulos de la impedancia medidos con las señales de herida ( $|Z_w|$ ) y control ( $|Z_m|$ ), mientras que la ecuación (B.3.5) describe las relaciones análogas entre los ángulos de fase de la impedancia. Las mismas están asociadas al comportamiento no lineal de la relación entre el voltaje y la corriente durante la aplicación de la señal de herida, como se describe en la sección B.2.7. Las pendientes de ambas ecuaciones son adimensionales, mientras que las ordenadas al origen están dadas en  $[\Omega^{-1}]$  y  $[\text{rad}^{-1}]$  para las ecuaciones (B.3.4) y (B.3.5), respectivamente. De estas ecuaciones surgen otros 4 parámetros característicos que se incluyen en el análisis, a saber, los parámetros  $a_1$ ,  $b_1$ ,  $a_2$  y  $b_2$ .

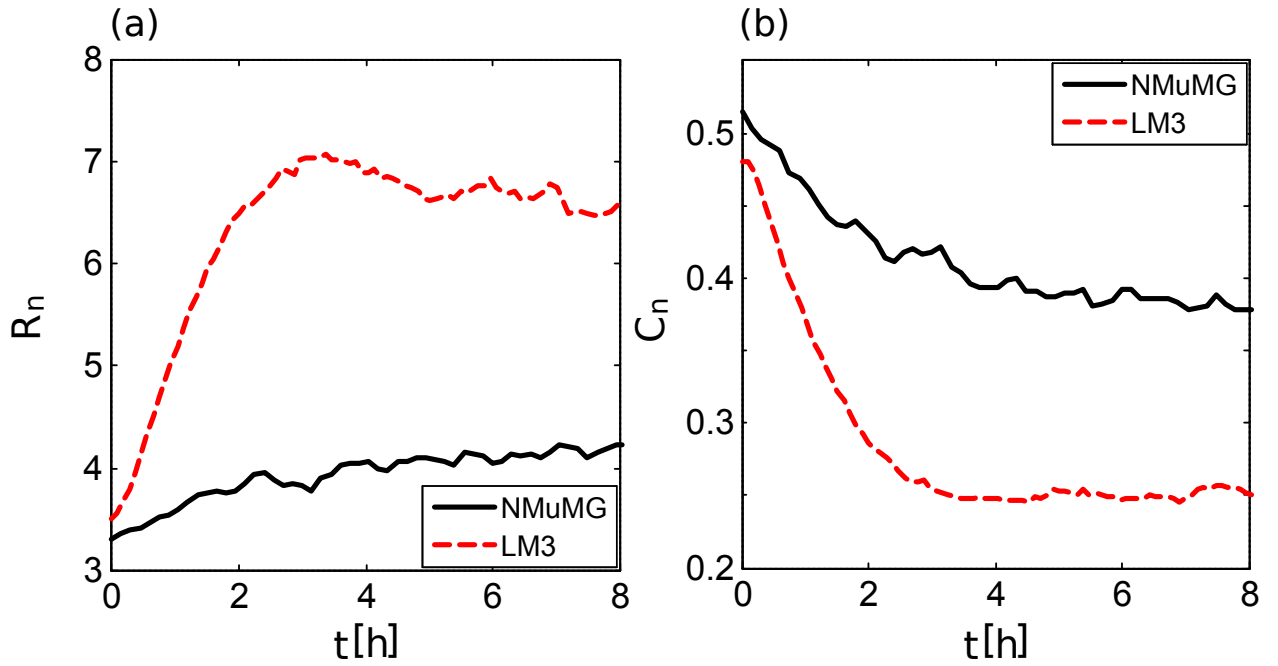
Finalmente, se observó que los cambios de impedancia durante la fase de herida (aplicando el protocolo descrito) son más notorios para las células cancerosas que para las normales. Por lo tanto, se calcularon los cambios fraccionales en resistencia  $\delta_R = (R_{\text{end}} - R_0)/R_0$  y capacidad  $\delta_C = (C_{\text{end}} - C_0)/C_0$ , donde ambas cantidades fueron medidas con la señal de control y tanto  $R_{\text{end}}$  como  $C_{\text{end}}$  representan los últimos valores medidos antes de iniciar la fase de cicatrización. Estas cantidades adimensionales fueron incluidas en el conjunto de parámetros característicos.

#### B.3.4.4. Fase de cicatrización

En esta última fase de medición, las células no dañadas que rodean el microelectrodo migran y proliferan para repoblar la porción dañada de la monocapa [17]. La dinámica de este proceso es diferente a la de la fase de crecimiento, pues en el estado inicial existe una alta densidad de células en la periferia del microelectrodo, las cuales se desplazan rápidamente para ocupar el espacio que dejaron las células muertas. Por lo tanto, la duración del régimen transitorio en la fase de cicatrización es mucho menor, y nuevamente se utilizó el método descrito en el Apéndice III en 6 experimentos diferentes y se determinó que es suficiente medir durante 8 horas para registrar completamente los cambios de impedancia correspondientes. Las frecuencias utilizadas en estas mediciones fueron las mismas que en la fase de crecimiento.

---

<sup>1</sup>Las ecuaciones son equivalentes, pero fueron reordenadas para facilitar el procesamiento de los datos.



**Figura B.3.6:** Mediciones de impedancia durante la fase de cicatrización. A  $t = 0$  se interrumpió la señal de herida y se inició una medición continua no invasiva. Se observa el crecimiento típico en la resistencia (a) y el decrecimiento en la capacidad (b) como consecuencia de la repoblación de la superficie dañada por parte de las células vivas circundantes. Las líneas sólidas negras representan un cultivo de células normales, mientras que las líneas cortadas rojas corresponden a células cancerosas. Como se esperaba, la tasa de cicatrización (en términos de la impedancia) de las células cancerosas resultó mayor que la correspondiente a las células normales. En este análisis, sólo se consideraron los valores medidos entre  $t = 0$  y  $t = 8$  h.

La Figura B.3.6 muestra la evolución temporal de la resistencia y la capacidad durante una medición de la fase de cicatrización para ambas líneas celulares. Como puede observarse, a medida que las células migran y proliferan la resistencia normalizada aumenta y la capacidad normalizada disminuye, y las tasas de cambio de estas magnitudes son claramente diferentes para ambas líneas celulares. Por lo tanto, se decidió emplear esta información para encontrar parámetros característicos de esta fase. En primer lugar, se calcularon los valores medios estacionarios de resistencia y capacidad normalizadas, lo que se logró promediando las señales correspondientes durante las últimas 2 horas de medición (es decir, entre  $t = 6$  h y  $t = 8$  h). Sean  $t_R$  y  $t_C$  los tiempos en horas para los cuales las señales cruzan por primera vez los valores medios  $R_s$  y  $C_s$ , respectivamente. Estos valores representan los tiempos característicos de cicatrización y fueron incluidos en el conjunto de parámetros de discriminación. Finalmente, se calcularon las siguientes cantidades:

$$m_R = \frac{R_s - R_0}{t_R}, \quad (\text{B.3.6})$$

$$m_C = \frac{C_0 - C_s}{t_C}. \quad (\text{B.3.7})$$

Aquí,  $R_0$  y  $C_0$  son la resistencia y capacidad normalizadas iniciales, mientras que  $m_R$  y

$m_C$  son magnitudes positivas dadas en  $[h^{-1}]$  que representan las tasas de cicatrización en términos de los cambios de resistencia y capacidad, respectivamente. Un total de 4 parámetros característicos se obtuvieron entonces en esta fase, a saber:  $t_R$ ,  $t_C$ ,  $m_R$  y  $m_C$ .

## B.3.5. Técnica de discriminación

### B.3.5.1. Análisis y selección de parámetros característicos

La Tabla B.3.1 resume los resultados obtenidos mediante el análisis de las mediciones según el protocolo propuesto. Se presenta cada fase de medición junto a sus correspondientes parámetros característicos, y para cada uno de ellos los valores medios y desvíos estándar para las poblaciones de células normales y cancerosas. Puede observarse que algunos parámetros poseen valores medios similares para ambas líneas celulares, pero sería incorrecto juzgar la capacidad discriminante de los mismos únicamente a partir de esta información. Asimismo, la dispersión de un parámetro específico dada por su desvío estándar no es un indicador confiable de su capacidad discriminatoria. Existen *tests* estadísticos que se ocupan de relacionar dos poblaciones de datos a partir de sus correspondientes distribuciones, y en la Tabla B.3.2 se muestra un análisis de este tipo realizado sobre los resultados de este trabajo. En dicha tabla, las últimas tres columnas muestran los resultados del *test F* (F), el *test de Student* (t) y el *test de Kolmogorov-Smirnov* (KS), respectivamente, aplicados sobre ambos conjuntos de datos para cada parámetro característico. La diferencia entre las varianzas de los dos conjuntos de datos se analiza mediante el *test F*, cuya hipótesis nula afirma que sus varianzas son en realidad consistentes. El *test de Student*, por otro lado, evalúa si los conjuntos de datos tienen diferentes medias, y su hipótesis nula afirma que sus medias son iguales. En todos los casos, se utilizó el *test t* de varianzas desiguales para los cálculos, siguiendo los lineamientos descritos en [21]. Finalmente, el *test de Kolmogorov-Smirnov* evalúa la hipótesis nula de que los dos conjuntos de datos fueron extraídos de la misma distribución. Los valores presentados en cada columna representan la probabilidad, según el *test* considerado, de que los dos conjuntos de datos (correspondientes a células normales y cancerosas) provengan de la misma distribución [59]. Probabilidades bajas indican que las dos poblaciones son diferentes, y en general un valor de  $p < 0.05$  se considera como estadísticamente significativo.

Observando los resultados de la Tabla B.3.2, puede verse que, por ejemplo, el parámetro característico  $R_n$  posee una muy elevada capacidad discriminante y, de hecho, en teoría podría utilizarse únicamente dicho parámetro para clasificar una muestra desconocida en normal o cancerosa. Sin embargo, estos resultados son específicos de células NMuMG y LM3, y es posible que las diferencias encontradas no sean tan significativas para otros tipos celulares. Otros parámetros característicos, no obstante, podrían ser menos específicos y por lo tanto representar un comportamiento más universal de las células normales y cancerosas. El uso de un vector de características multidimensional como información de entrada en un

modelo de discriminación tiene la ventaja de ser más general en el sentido de que considera diferentes aspectos del comportamiento celular.

**Tabla B.3.1:** Parámetros característicos extraídos de las mediciones de impedancia eléctrica según el protocolo desarrollado. Se presentan los valores medios y desvíos estándar para cada uno de ellos, separados según las fases correspondientes y el tipo de célula. El conjunto de datos posee 22 muestras de células normales (NMuMG) y 19 de cancerosas (LM3). G: fase de crecimiento. C: fase de confluencia. W: fase de herida. H: fase de cicatrización.

Fase	Parámetro	Unidades	NMuMG		LM3	
			$\mathbf{x_m}$	$\sigma$	$\mathbf{x_m}$	$\sigma$
G	$t_p$	[h]	8.5	4.1	13.6	1.9
	$R_p$	[adim]	0.95	0.21	0.52	0.51
	$t_G$	[h]	9.1	6.1	5.3	4.3
	$s_C$	[h <sup>-1</sup> ]	$4.1 \times 10^{-2}$	$3.4 \times 10^{-2}$	0.12	$5.7 \times 10^{-2}$
C	$R_n$	[adim]	2.8	0.66	7.0	2.0
	$L_f$	[adim]	9.6	0.52	8.6	0.20
	$C_n$	[adim]	0.30	$7.9 \times 10^{-2}$	0.17	$4.1 \times 10^{-2}$
	$\sigma_R$	[adim]	0.35	0.24	1.2	0.81
	$\sigma_C$	[adim]	$5.1 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-2}$
	$\alpha$	[ $\Omega^{1/2} \cdot \text{cm}$ ]	2.6	0.66	5.7	0.93
	$R_b$	[ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	0.64	0.42	3.2	1.9
	$C_m$	[ $\mu F \cdot \text{cm}^{-2}$ ]	2.0	0.92	2.3	0.42
W	$a_R$	[s <sup>-1</sup> ]	$-2.0 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-3}$	$-4.6 \times 10^{-3}$	$7.7 \times 10^{-4}$
	$b_R$	[adim]	7.8	0.33	8.5	0.16
	$a_C$	[s <sup>-1</sup> ]	$2.5 \times 10^{-3}$	$2.9 \times 10^{-3}$	$8.2 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-3}$
	$b_C$	[adim]	-19.4	0.31	-20.4	0.29
	$a_1$	[adim]	0.61	0.26	0.68	0.16
	$b_1$	[ $\Omega^{-1}$ ]	$2.0 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$4.4 \times 10^{-5}$
	$a_2$	[adim]	0.51	0.44	0.55	0.22
	$b_2$	[rad <sup>-1</sup> ]	-1.3	1.1	-1.1	0.42
	$\delta_R$	[adim]	-0.20	0.15	-0.51	$4.9 \times 10^{-2}$
	$\delta_C$	[adim]	0.30	0.30	1.7	0.56
H	$t_R$	[h]	4.5	2.3	4.5	1.7
	$m_R$	[h <sup>-1</sup> ]	$5.3 \times 10^{-2}$	$4.6 \times 10^{-1}$	1.4	0.966
	$t_C$	[h]	4.6	1.9	4.9	1.3
	$m_C$	[h <sup>-1</sup> ]	$5.1 \times 10^{-2}$	$7.8 \times 10^{-2}$	0.46	0.19

**Tabla B.3.2:** Parámetros característicos y *tests* estadísticos. Valores de probabilidad menores a  $1 \times 10^{-6}$  han sido redondeados a 0. Los parámetros característicos marcados con (\*) se consideran relevantes en el modelo de discriminación propuesto. G: fase de crecimiento. C: fase de confluencia. W: fase de herida. H: fase de cicatrización.

Fase	Parámetro	F test	t test	KS test
G	$t_p$ (*)	$2.1 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-5}$	$9.7 \times 10^{-4}$
	$R_p$ (*)	$2.2 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-3}$	0
	$t_G$	$1.4 \times 10^{-1}$	$2.6 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^{-4}$
	$s_C$ (*)	$2.7 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-4}$
C	$R_n$ (*)	$2.1 \times 10^{-5}$	0	0
	$C_n$ (*)	$1.4 \times 10^{-2}$	$1.4 \times 10^{-6}$	$6.0 \times 10^{-6}$
	$L_f$ (*)	$5.8 \times 10^{-4}$	0	0
	$\alpha$ (*)	0.21	0	0
	$R_b$ (*)	0	$8.8 \times 10^{-5}$	$2.9 \times 10^{-5}$
	$C_m$	$3.5 \times 10^{-3}$	0.23	0.74
	$\sigma_R$	$4.9 \times 10^{-6}$	$5.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-3}$
	$\sigma_C$	$7.6 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-2}$
W	$a_1$	0.20	0.43	1.0
	$b_1$	$2.4 \times 10^{-4}$	$6.0 \times 10^{-2}$	0.31
	$a_2$	$4.2 \times 10^{-2}$	0.85	0.92
	$b_2$	$5.8 \times 10^{-3}$	0.45	1.0
	$a_R$	$1.9 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-3}$	$8.6 \times 10^{-4}$
	$b_R$ (*)	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$
	$a_C$ (*)	$3.4 \times 10^{-2}$	$5.8 \times 10^{-6}$	$8.6 \times 10^{-4}$
	$b_C$ (*)	0.83	0	$2.7 \times 10^{-5}$
	$\delta_R$ (*)	$1.2 \times 10^{-3}$	$5.2 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$
	$\delta_C$ (*)	$3.7 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$
H	$t_R$	0.26	1.0	0.9
	$m_R$ (*)	$3.8 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-5}$	0
	$t_C$	0.29	0.67	0.88
	$m_C$ (*)	$7.0 \times 10^{-4}$	0	0

Antes de utilizar cualquier algoritmo de discriminación, resulta de importancia práctica efectuar una reducción de la dimensión del problema en base la selección de parámetros característicos relevantes [60]. Además, esto da una mejor perspectiva del problema, haciendo foco sólo en aquellos parámetros que permitan una separación significativa entre las dos poblaciones. Se consideraron valores de  $p < 1 \times 10^{-3}$  como los más significativos y se seleccionaron únicamente aquellos parámetros característicos que presentaron esta condición

simultáneamente bajo el *test* KS y alguno de los otros *tests*. Siguiendo este criterio, los resultados presentados en la tabla B.3.2 sugieren que sólo 15 de los 26 parámetros característicos originales son relevantes en términos de su capacidad discriminante. Por lo tanto, el análisis que sigue está basado en este vector de parámetros de 15 dimensiones.

### B.3.5.2. Análisis de discriminante lineal (LDA)

El objetivo del algoritmo LDA es encontrar un vector unitario  $\mathbf{w}$  que maximice el cociente de las dispersiones inter- e intrapoblacionales cuando los puntos experimentales son proyectados en él, permitiendo una máxima separación entre poblaciones [60]. La dispersión intrapoblacional  $S_W$  está dada entre los puntos de cada población por separado, y da una idea de qué tan dispersos están los valores de cada una (valores bajos indican que la nube de puntos está muy concentrada). En cambio, la dispersión interpoblacional  $S_B$  está asociada a la distancia entre las medias poblacionales, y es tanto mayor cuanto más separadas están entre sí dichas medias. El método LDA maximiza el cociente  $S_B/S_W$ , y por ello permite una máxima separación entre ambas poblaciones.

Dados dos conjuntos de vectores de características (en este caso, de 15 dimensiones) correspondientes a las poblaciones “N” (células normales) y “L” (células cancerosas), pueden definirse sus medias poblacionales  $\boldsymbol{\mu}_N$  y  $\boldsymbol{\mu}_L$  (también vectores de 15 dimensiones) y sus matrices de covarianza  $\Sigma_N$  y  $\Sigma_L$ , respectivamente. Sea  $\mathbf{x}_i$  un vector de características de la población  $i = N, L$ . Entonces, si se define un vector unitario  $\mathbf{w}$  de 15 dimensiones, la combinación lineal dada por  $\mathbf{w} \cdot \mathbf{x}_i$  tendrá media  $m_i$  y varianza  $s_i^2$ . El criterio de optimización para hallar  $\mathbf{w}$  según lo establecido en el párrafo anterior consiste en maximizar lo que se conoce como objetivo de Fisher [60]:

$$J = \frac{(m_N - m_L)^2}{s_N^2 + s_L^2}. \quad (\text{B.3.8})$$

La dependencia explícita de  $J$  con el vector  $\mathbf{w}$  puede hallarse teniendo en cuenta que el numerador de la ecuación (B.3.8) es la distancia entre las medias proyectadas, que viene dada por:

$$(m_N - m_L)^2 = \mathbf{w}^T S_B \mathbf{w}, \quad (\text{B.3.9})$$

y que el denominador es la suma de las dispersiones proyectadas, dada por:

$$s_N^2 + s_L^2 = \mathbf{w}^T S_W \mathbf{w}. \quad (\text{B.3.10})$$

En las ecuaciones (B.3.9) y (B.3.10) aparecen las dos matrices de dispersión mencionadas en el primer párrafo de esta sección, a saber,  $S_B$  y  $S_W$ , que se relacionan con las medias y

varianzas poblacionales según las ecuaciones:

$$S_B = (\mu_N - \mu_L)(\mu_N - \mu_L)^T, \quad (\text{B.3.11})$$

$$S_W = M_N \cdot \Sigma_N + M_L \cdot \Sigma_L, \quad (\text{B.3.12})$$

donde  $M_N$  y  $M_L$  representan el número de vectores de características presentes en cada conjunto de datos. El criterio de optimización de Fisher puede entonces escribirse en términos de  $\mathbf{w}$  y de dichas dispersiones de la siguiente manera:

$$\max_{\mathbf{w}} J(\mathbf{w}) = \max_{\mathbf{w}} \frac{\mathbf{w}^T S_B \mathbf{w}}{\mathbf{w}^T S_W \mathbf{w}}, \quad (\text{B.3.13})$$

que representa un problema de autovalores generalizado:

$$S_B \mathbf{w} = \lambda S_W \mathbf{w}. \quad (\text{B.3.14})$$

En la ecuación (B.3.14), la solución óptima para  $\mathbf{w}$  es el autovector de la matriz  $S_W^{-1} S_B$  correspondiente al máximo autovalor. De esta manera, dados los conjuntos de vectores característicos de ambas líneas celulares, puede determinarse este vector y analizar la separación resultante entre ambas poblaciones.

Sea ahora  $\mathbf{x}$  un punto sin clasificar (muestra de origen desconocido) en el espacio 15-dimensional bajo análisis. Las distancias euclídeas entre este punto y las medias poblacionales correspondientes a ambos tipos celulares, sobre la dirección dada por  $\mathbf{w}$ , están dadas por:

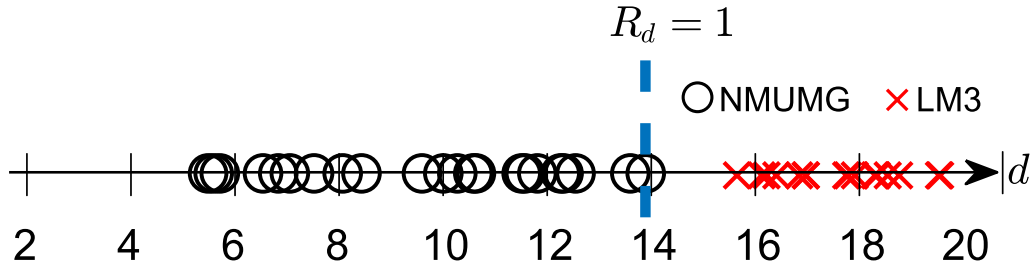
$$d_N = \mathbf{w}^T \cdot \mathbf{x} - \mu_N, \quad (\text{B.3.15})$$

$$d_L = \mathbf{w}^T \cdot \mathbf{x} - \mu_L, \quad (\text{B.3.16})$$

donde  $d_N$  y  $\mu_N$  son la distancia euclídea y la media poblacional (proyectada en  $\mathbf{w}$ ) correspondientes a la población de células normales (NMuMG), y  $d_L$  y  $\mu_L$  corresponden a las células cancerosas (LM3). Si consideramos estas distancias como nuevos parámetros característicos, el problema se reduce a una única dimensión. El criterio para seleccionar si un vector de datos desconocido  $\mathbf{x}$  proviene de un cultivo celular normal o canceroso se basa en medir el cociente entre las distancias euclídeas  $R_d = d_L/d_N$  y asumir que valores de  $R_d$  menores a 1 corresponden a células cancerosas y valores mayores que 1 representan células normales.

Antes de implementar este algoritmo en los datos medidos, se debe realizar una consideración. Los conjuntos de datos experimentales provenientes de células normales y cancerosas recolectados en este capítulo consisten en vectores de parámetros característicos tanto completos como incompletos. Un vector completo posee valores determinados de los 15 parámetros involucradas, mientras que en uno incompleto faltan algunos de estos valores. Esto es un problema muy recurrente en trabajos experimentales, sobre todo cuando se trata de experimentos en investigaciones biológicas [61] y médicas [62]. Debido a esto, es necesario

considerar un método para tratar los datos faltantes antes de poder implementar el algoritmo LDA. Siguiendo las recomendaciones brindadas por Hufnagel [63], se determinó la proporción media de observaciones faltantes en los experimentos realizados, que fue  $m_N = 0.21$  para células NMuMG y  $m_L = 0.27$  para células LM3. El tamaño de las muestras iniciales fue 22 para células normales y 19 para las cancerosas. En base a esta información, la opción más razonable que se encontró para completar las observaciones faltantes es el método de Dear [64, 65], el cual se basa en una aproximación al primer componente principal y no realiza suposiciones acerca de las distribuciones de los parámetros característicos faltantes. Se empleó este método para completar los datos faltantes en los vectores de parámetros característicos y se implementó el algoritmo LDA sobre el nuevo conjunto de datos. Los resultados se presentan en la Figura B.3.7.



**Figura B.3.7:** Distancias euclídeas con respecto a la dirección dada por el vector discriminante  $\mathbf{w}$ . Los datos experimentales se representan como círculos negros y cruces rojas para células normales y cancerosas, respectivamente. La línea cortada azul ubicada aproximadamente en  $d \simeq 13.9$  representa la frontera entre ambas poblaciones, es decir, un hiperplano sobre el cual las distancias euclídeas con respecto a ambas medias poblacionales son idénticas y por lo tanto  $R_d = 1$ . El modelo clasifica un nuevo dato experimental como normal si su proyección sobre  $\mathbf{w}$  se encuentra en el lado izquierdo de esta frontera ( $R_d > 1$ ), y como canceroso si se encuentra en el lado derecho de la misma ( $R_d < 1$ ).

La Figura B.3.7 muestra las proyecciones de los vectores de datos 15-dimensionales en la dirección dada por el vector discriminante unitario  $\mathbf{w}$ . La línea vertical representa el hiperplano perpendicular a  $\mathbf{w}$  para el cual  $R_d = 1$ , y los datos experimentales correspondientes a ambas poblaciones celulares están dispersos alrededor del mismo. Como puede observarse, el modelo propuesto logra una clara separación entre poblaciones, con un único dato mal clasificado (proveniente de la línea NMuMG). Esto resulta en un 4,5 % de falsos positivos y ningún falso negativo.

## B.3.6. Conclusiones

Se desarrolló un protocolo de medición que consiste en un conjunto de técnicas basadas en ECIS y que analiza distintas facetas del comportamiento celular, brindando información relevante que permite caracterizar diferentes líneas celulares.

Se determinó un conjunto de parámetros característicos de células normales y cancerosas que permiten separarlas en poblaciones diferentes. Los valores de dichos parámetros pueden



ser estimados a partir de las mediciones realizadas según el protocolo desarrollado.

Considerando únicamente los parámetros característicos más relevantes, se efectuó un análisis de discriminante lineal (LDA) para lograr la discriminación propuesta entre células normales y cancerosas.

La técnica implementada permite discriminar efectivamente células NMuMG de LM3, cultivadas *in vitro*, con tan sólo 4,5% de falsos positivos y 0% de falsos negativos. No obstante, dada la generalidad con que se escogió los parámetros característicos, la misma podría ser utilizada para el estudio de otras líneas celulares normales y cancerosas. En particular, los resultados de la fase de crecimiento y confluencia obtenidos en este trabajo (con células glandulares) están en concordancia con el estudio realizado en células WI38 y WI38-VA13 (fibroblastos) publicado por Giaever y Keese [10].

## Parte C

### Análisis de cultivos celulares mixtos

# Capítulo C.1

## Desarrollo de microelectrodos para mediciones de impedancia en cultivos celulares

### C.1.1. Resumen

En este capítulo se presentan las técnicas de microfabricación utilizadas en la producción de MEAs para mediciones de impedancia eléctrica de cultivos celulares *in vitro*. Uno de los objetivos que persigue esta tesis es realizar un experimento de discriminación en cultivos mixtos de células normales y cancerosas (es decir, ambos tipos celulares cultivados en un mismo *well*). Como parte del camino que debe recorrerse para obtener esos resultados, se propone la fabricación de sensores de impedancia que posean resolución espacial. A través de un extenso análisis experimental basado en un estudio previo [26], se determinaron primero las condiciones óptimas del proceso de microfabricación (Tabla C.1.1). Una vez puesto a punto dicho proceso, se diseñaron y fabricaron diferentes tipos de MEAs (Sección C.1.4.5) para ser utilizados en los experimentos de cultivos mixtos. Además, se evaluó un nuevo material (aleación de oro/cobre) como base para la fabricación de MEAs y en este capítulo se presentan los resultados obtenidos tanto para microelectrodos desnudos como cubiertos con células.

A continuación se resume el contenido de este capítulo:

- En la Sección C.1.2 se expresan los objetivos principales que se persiguen con la fabricación de MEAs para esta tesis.
- En la Sección C.1.3 se describen brevemente las diferentes técnicas de microfabricación utilizadas en este trabajo para la producción de MEAs.
- En la Sección C.1.4 se detalla el desarrollo de los MEAs. La manera en que fueron diseñadas y obtenidas las máscaras utilizadas para su fabricación se explica en la Sec-

ción C.1.4.2. En la Sección C.1.4.3 se desarrolla un protocolo de microfabricación con las condiciones óptimas determinadas a partir de la experimentación, y en la Sección C.1.4.5 se describen los tipos de MEAs fabricados en el marco de esta tesis.

- En la Sección C.1.5 se muestran resultados experimentales de mediciones de impedancia eléctrica efectuadas sobre electrodos desnudos y cubiertos con células, utilizando como materiales oro puro y una aleación de oro/cobre.

## C.1.2. Introducción

El término “microfabricación” designa el conjunto de técnicas empleadas para la producción de dispositivos en la escala micrométrica. Se utiliza en la fabricación de circuitos integrados, microsensores, células solares, componentes optoelectrónicos y sistemas microelectromecánicos (MEMS), entre otras cosas. Las dimensiones típicas de trabajo están en el orden de  $1\text{ }\mu\text{m}$  en el plano del sustrato<sup>1</sup> (“plano horizontal”), mientras que en el plano vertical las distancias varían desde capas atómicas (del orden de  $0.1\text{ nm}$ ) hasta cientos de micrometros [66].

La técnica ECIS (Capítulo A.2) se basa en el cultivo de células sobre arreglos de microelectrodos, es decir, electrodos de tamaño micrométrico. La empresa Applied Biophysics produce sistemas de medición ECIS completos, incluyendo los MEAs, y los comercializa en todo el mundo. Los MEAs típicos consisten en matrices de entre 8 y 96 *wells*, cada uno con un único microelectrodo activo y un contraelectrodo (de igual o diferente tamaño). En la Sección B.1.1.1 se describieron dos MEAs comerciales utilizados en algunos experimentos de esta tesis. En general, el microelectrodo abarca una porción muy pequeña del área total del cultivo, con lo cual la información obtenida es representativa de una porción igualmente pequeña de la monocapa celular. En la mayoría de las aplicaciones esto no es relevante, ya que se trabaja con líneas celulares que poseen propiedades homogéneas a lo largo de toda la monocapa. No obstante, en el marco de esta tesis se desarrolló una técnica de discriminación entre células normales y cancerosas (Capítulo B.3) y resulta de interés aplicarla en un experimento de discriminación sobre un cultivo mixto de ambos tipos celulares. En el experimento planteado se desconoce la manera en que se desarrollará dicho cultivo y, en caso de formarse una monocapa, se espera que posea propiedades heterogéneas que dependan del tipo de célula adherida en cada elemento de área del cultivo. Por lo tanto, para poder detectar la presencia de un tipo particular de célula en un experimento de este tipo, se requiere un MEA que permita extraer información de diferentes regiones del cultivo en un mismo *well*. Esto motiva el desarrollo que se expone en este capítulo, cuyo objetivo principal es la obtención de MEAs con resolución espacial para ser aplicados en experimentos de discriminación en cultivos celulares mixtos.

---

<sup>1</sup>Se llama “sustrato” a la pieza de material base sobre la cual se construye un dispositivo.

La fabricación de los MEAs utilizados en esta tesis se realizó en las instalaciones de la Sala Limpia del Centro Atómico Bariloche. Algunos de los procedimientos descritos en este capítulo se basaron en un trabajo previo realizado por el Dr. Walter Bast [26], los cuales fueron modificados según las necesidades propias de esta investigación y según la disponibilidad de los materiales y equipos utilizados para la microfabricación.

### C.1.3. Técnicas de microfabricación utilizadas

#### C.1.3.1. Fotolitografía

La fotolitografía (también llamada litografía óptica), tal y como fue empleada en este trabajo, es una técnica basada en el uso de una lámpara ultravioleta para exponer, a través de una máscara, materiales fotosensibles (llamados *fotoresinas* de aquí en adelante) que están depositados sobre un sustrato con el objeto de transferir un determinado patrón de la máscara al sustrato. Una máscara consiste en un patrón opaco (generalmente de cromo, o tinta de impresora en máscaras menos sofisticadas) ubicado en la superficie de algún soporte sólido (generalmente una hoja de acetato o una placa de *sodalime*), y su función es bloquear el paso de la luz en lugares específicamente seleccionados, de forma tal que la energía de la radiación se transfiera a la capa de fotoresina únicamente sobre el patrón formado por las zonas transparentes. En la Sección C.1.4.5 se muestran imágenes de las máscaras utilizadas en este trabajo.

Luego de la exposición a la radiación, la muestra se somete a un proceso de revelado, que consiste en ponerla en contacto con una solución reveladora, la cual disuelve selectivamente una porción de la fotoresina y deja el resto sin disolver. Existen dos tipos de fotoresinas:

1. Fotoresinas positivas: son inicialmente insolubles en la solución reveladora, y tras la exposición se vuelven solubles.
2. Fotoresinas negativas: son inicialmente solubles en la solución reveladora, y tras la exposición se vuelven insolubles.

Finalizado el revelado, se obtiene sobre el sustrato un patrón de fotoresina que coincide con el diseño de la máscara. Si se deseara eliminar toda la fotoresina depositada sobre una muestra (es decir, sin seleccionar un patrón específico), se puede sumergir la misma en acetona, ya que ésta disuelve la fotoresina independientemente de que haya sido expuesta a la radiación UV o no.

Una vez formado dicho patrón, pueden efectuarse diferentes procesos sobre la muestra: por ejemplo, las áreas expuestas (sin fotoresina) del material que se encuentra inmediata-

mente debajo de la capa de fotoresina pueden ser “comidas”<sup>2</sup> químicamente o mediante un plasma<sup>3</sup> que no ataque la fotoresina. Luego de esto, se remueve la fotoresina con acetona y el resultado final es un patrón del material deseado idéntico al de la máscara. Además, puede utilizarse una capa de fotoresina como aislante eléctrico. Ambos usos de la fotolitografía serán detallados en la sección C.1.4.3.

Las etapas involucradas en el procesamiento de una muestra mediante fotolitografía se describen a continuación:

1. Deposición de la resina (*spin-coating*): se realiza utilizando un equipo conocido como *spin-coater* (Spin150-v3 Spin Coater). El mismo posee una cámara cerrada que contiene un soporte giratorio donde se coloca la muestra, la cual queda sujeta al mismo mediante un sistema de vacío. Se coloca una cierta cantidad de fotoresina sobre la muestra y luego se inicia el proceso. El soporte gira rápidamente (a varias miles de rpm, según el espesor deseado), haciendo que la fotoresina se distribuya sobre la muestra de manera uniforme hasta alcanzar el espesor deseado, que depende de la velocidad, aceleración y duración del giro. Todos estos parámetros pueden ajustarse para lograr diferentes resultados.
2. Cocción: se colocan las muestras con fotoresina sobre una plancha caliente (la temperatura depende del tipo de resina) para evaporar el solvente.
3. Alineación y exposición UV: las muestras se depositan en una máquina alineadora (SÜSS Microtec MJB4) que posee una fuente de radiación UV. Se coloca la máscara en la alineadora y se ajusta la posición de ésta relativa a la muestra mediante un conjunto de tornillos, y el procedimiento se visualiza con un microscopio. Una vez realizada la alineación, se efectúa la exposición UV durante un tiempo especificado (que depende del tipo de resina y de su espesor).
4. Revelado: las muestras expuestas se ponen en contacto con una solución reveladora durante una cierta cantidad de tiempo (lo que depende del tipo de resina y del tiempo de exposición) hasta que se disuelven completamente las regiones que fueron expuestas (en el caso de resinas positivas) o no expuestas (en el caso de resinas negativas).

---

<sup>2</sup>El término en inglés para referirse a este proceso es *etching*. No se encontró una traducción satisfactoria para esta palabra, y en la jerga de microfabricación (por lo menos en la Sala Limpia del Centro Atómico Bariloche) se utilizan la palabra “comido” y el verbo “comer” para referirse a este proceso, por lo que se decidió adoptar dicha terminología en esta tesis.

<sup>3</sup>Se llama “plasma” a un estado de la materia en el cual una sustancia gaseosa ionizada se vuelve altamente conductora de la electricidad.

### C.1.3.2. *Sputtering*

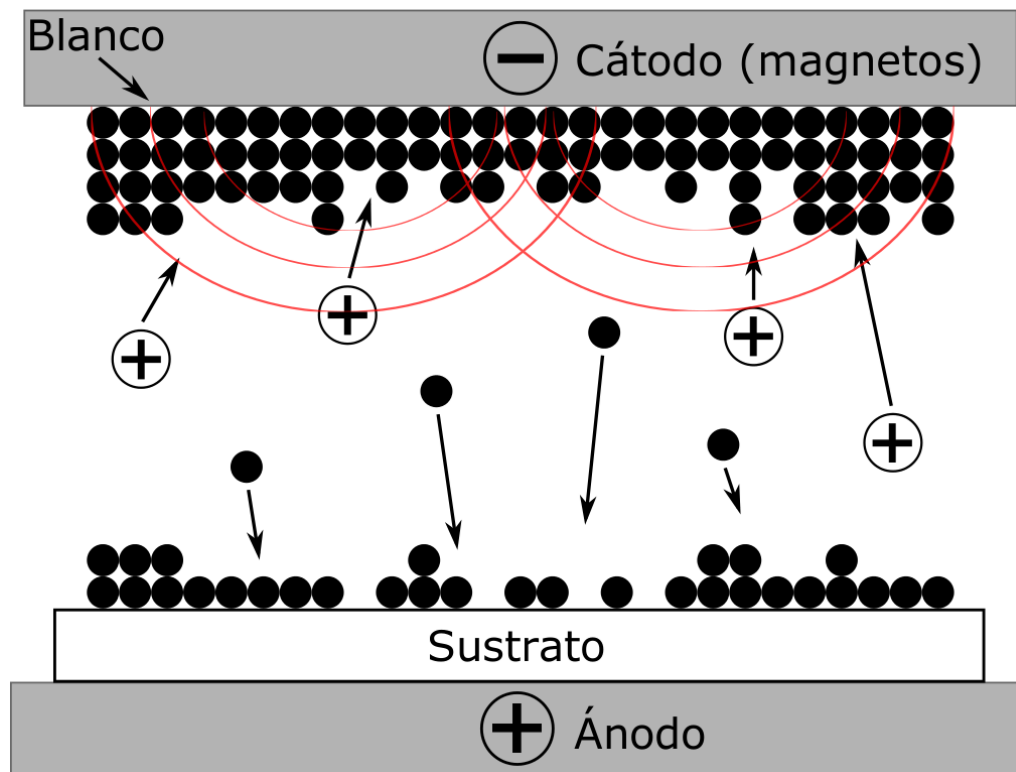
Se conoce con el nombre de *sputtering* a una técnica de deposición física de vapor<sup>4</sup> en la que se utiliza un plasma de argón (Ar) para atacar la superficie de un blanco metálico (en este trabajo, de oro o una aleación de oro/cobre) y depositar sus átomos sobre un sustrato [66]. Para ello, se coloca en primer lugar el sustrato sobre una plataforma metálica que se encuentra en el interior de una cámara de vacío. A una distancia de algunos centímetros sobre dicha plataforma se coloca el blanco metálico del material a depositar, el cual se encuentra firmemente sujeto a un soporte metálico y en un plano paralelo al plano que contiene al sustrato. La cámara se conecta a una bomba de vacío hasta alcanzar presiones del orden de 1 Pa, y luego se deja ingresar gas argón de alta pureza hasta alcanzar presiones del orden de los 10 Pa. Luego, se aplica una diferencia de potencial eléctrico continuo entre el blanco (cátodo) y la plataforma sobre la cual se encuentra el sustrato (ánodo), como se muestra en la Figura C.1.1. La magnitud de dicha diferencia de potencial están generalmente en el rango entre 2 y 5 kV. La aplicación de este potencial produce una descarga luminiscente (*glow discharge*) que se debe a la ionización del Ar y formación de plasma (de color violeta). Los cationes  $\text{Ar}^+$  son acelerados hacia el blanco (cargado negativamente) y, al colisionar con su superficie, desprenden átomos del metal<sup>5</sup>. Los átomos metálicos desprendidos son transportados a través del vacío hacia el ánodo (cargado positivamente) y por lo tanto hacia el sustrato. Estos átomos colisionan energéticamente (5 - 20 eV) con la superficie del sustrato y se depositan formando una película. Los parámetros más importantes en el proceso de deposición mediante *sputtering* son la presión y la corriente. En la Sección C.1.4.3 se describen las condiciones operativas utilizadas en este trabajo.

El equipo utilizado en este trabajo fue el Pelco SC-6 *Sputter-coater*, el cual utiliza magnetos detrás del cátodo para atrapar los electrones sobre el material del blanco cargado negativamente, de forma tal de evitar que se encuentren libres para bombardear al sustrato, lo cual permite alcanzar mayores tasas de deposición. El *sputtering* se realizó con un equipo ubicado en el Laboratorio de Bajas Temperaturas del Centro Atómico Bariloche, utilizando blancos de Au (radio: 57 mm, espesor: 0.1 mm, Ted Pella, Inc.) y AuCu (radio: 57 mm, espesor: 0.5 mm). Posteriormente, un equipo idéntico fue adquirido por la Sala Limpia del mismo Centro Atómico y a partir de entonces se utilizó este último, lo que permitió realizar el proceso completo de microfabricación sin retirar las muestras del ambiente libre de partículas de la sala limpia. Una fotografía del equipo se muestra en el Apéndice IV, junto con las instrucciones para su operación.

---

<sup>4</sup>La idea general de los métodos de deposición física de vapor (PVD) es el desprendimiento de átomos de un blanco de material sólido, seguido por el transporte de dichos átomos a través del vacío hacia la superficie del sustrato, donde condensan y forman una película.

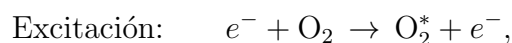
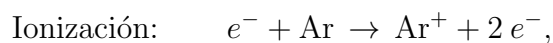
<sup>5</sup>Se llama *rendimiento de sputtering* al número de átomos del blanco que se desprenden por cada ion incidente. Este valor oscila entre 0.5 y 4, según el tipo de material. Para Au y AuCu, el rendimiento se encuentra entre 1 y 2.



**Figura C.1.1:** Fundamentos de la deposición de un metal mediante *sputtering*. Los iones de Ar (positivos) son acelerados hacia el blanco metálico (cargado negativamente), y la energía de las colisiones resultantes hace que se desprendan átomos de la superficie metálica. Los átomos desprendidos viajan a través del vacío hacia el sustrato (apoyado sobre una plataforma metálica cargada positivamente), donde condensan y forman una película.

### C.1.3.3. Reactive Ion Etching

Esta técnica utiliza un plasma químicamente reactivo para remover material depositado en muestras durante el proceso de microfabricación [66]. Dicho plasma es generado aplicando un campo de radiofrecuencia en una cámara que contiene un gas de alta pureza (por ejemplo, Ar, O<sub>2</sub> o SF<sub>6</sub>) a muy alto vacío. Las especies químicas generadas, de elevada energía, atacan la superficie de la muestra y reaccionan selectivamente con los materiales que se desea remover. La descarga luminiscente genera tanto iones como moléculas neutras excitadas, y ambas son importantes para la operación de comido (*etching*). Algunos ejemplos de las reacciones que pueden ocurrir durante la descarga son:



En general, tanto las especies químicas excitadas como las ionizadas son importantes en este proceso. En este trabajo, no obstante, se utilizó argón como gas de ataque para remover únicamente oro y una aleación de oro/cobre. Bajo estas condiciones, las especies



químicas predominantes son iones, los procesos de remoción de material involucrados son principalmente físicos y el comido actúa de manera similar al *sputtering*, sólo que en este caso los iones  $\text{Ar}^+$  son acelerados hacia el sustrato y los átomos de Au o Cu son removidos de éste y depositados en la superficie interna de la cámara de vacío del equipo.

Para lograr la remoción únicamente de las porciones deseadas de la capa metálica, es necesario colocar una máscara sobre ésta. Los iones  $\text{Ar}^+$  remueven eficientemente los materiales metálicos mencionados a una tasa mucho mayor en comparación con la tasa de comido de la resina fotosensible  $\mu\text{Posit 1400-31}$  (utilizada para fotolitografía) con el mismo gas. Esto es una gran ventaja, ya que las máscaras de fotoresina son muy sencillas de generar, realizando simplemente una fotolitografía sobre la capa metálica. Una vez finalizado el comido, se remueve la máscara mediante una limpieza química con acetona. No obstante, hay una precaución que debe tenerse en cuenta: la temperatura de la fotoresina no debe elevarse demasiado, ya que podría superar su temperatura de transición vítrea, modificando sus propiedades mecánicas y dificultando su remoción mediante acetona. Para evitar este incremento indeseado de temperatura, se debe realizar el comido de manera pulsada, es decir, acelerando los iones durante unos pocos segundos y luego dejando reposar el sistema durante algunos minutos para que se enfríe, repitiendo luego el procedimiento tantas veces como fuera necesario hasta alcanzar el tiempo total de comido. Los parámetros más importantes del comido mediante plasma son la presión, el caudal de gas, la potencia de RF para la generación del plasma, la potencia de RF para acelerar los iones, la frecuencia de pulsado y el tiempo total de comido. En la Sección C.1.4.3 se presentan los valores óptimos de estos parámetros para las aplicaciones llevadas a cabo en este trabajo.

El equipo que se utilizó para realizar el comido mediante plasma es de la marca AJA International. En el Apéndice IV se muestran fotografías de las diferentes partes del mismo y las instrucciones para su operación.

#### C.1.3.4. Plasma de oxígeno

La técnica de *plasma oxygen* (plasma de oxígeno) consiste en el tratamiento superficial de una muestra con dicha sustancia, y se utiliza para realizar una limpieza profunda de los sustratos y de los MEAs en ciertas etapas del proceso de microfabricación. Se ha demostrado que las especies iónicas presentes en el plasma interactúan con las partículas de suciedad (particularmente las moléculas orgánicas, como las fotoresinas) y las remueven muy eficientemente [67]. Este proceso de limpieza resultó fundamental en la fabricación de MEAs para pretratar los sustratos de vidrio antes de la deposición de la capa metálica, para eliminar residuos de resina fotosensible luego de la etapa de RIE y como limpieza final antes de utilizar el MEA para realizar cultivos celulares. En la Sección C.1.4.3 se detallan los usos específicos de esta técnica en este trabajo, así como las condiciones operativas óptimas.

Para realizar este proceso, se utilizó un equipo ubicado en la Sala Limpia del Centro

Atómico Bariloche (*Plasma-Preen I Plasma Cleaner*), que es esencialmente un horno microondas que posee una cámara de vacío en su interior. Las muestras a procesar se colocan en dicha cámara y una bomba de vacío lleva la presión hasta valores del orden de los 50 Pa. Luego, se deja ingresar  $O_2$  de muy alta pureza a la cámara y se genera una descarga luminiscente mediante un magnetrón<sup>6</sup> con potencias de entre 100 y 500 W. Mientras la descarga está activa, se produce una limpieza de las superficies por la interacción de las especies químicas presentes en el plasma, y dicha interacción tiene como consecuencia un aumento de la temperatura de las muestras y de la cámara de vacío. Si se mantiene el plasma durante un tiempo prolongado (más de 30 segundos), el *o-ring*<sup>7</sup> puede dañarse, permitiendo el ingreso de aire a la cámara de vacío y perjudicando el tratamiento (las especies químicas que se forman en el plasma que posee impurezas pueden dañar el material de las muestras). Por lo tanto, al igual que en el caso de la técnica RIE, es necesario realizar el tratamiento con plasma de  $O_2$  de manera pulsada. Los parámetros más importantes de este proceso son la presión, el caudal de  $O_2$  y el tiempo de tratamiento. En la Sección C.1.4.3 se indican los valores óptimos de dichos parámetros para la fabricación de MEAs, mientras que en el Apéndice IV se muestran fotografías del equipo y se brindan instrucciones para su uso.

## C.1.4. Desarrollo de arreglos de microelectrodos

### C.1.4.1. Calibración de la deposición mediante *sputtering*

En un trabajo anterior [26] se presentaron valores óptimos de los parámetros de deposición de Au y AuCu mediante *sputtering* sobre sustratos de vidrio. Los mismos son óptimos en el sentido de que permiten una buena adherencia del metal al vidrio, asegurando el correcto funcionamiento del MEA a lo largo de un experimento. No obstante, en el presente trabajo no se obtuvieron resultados satisfactorios empleando dichos valores. Esto se debe a que los parámetros óptimos de deposición dependen fuertemente de condiciones variables tales como la composición del gas, la composición y el grado de desgaste del blanco y la posición relativa entre el blanco y el sustrato. Por lo tanto, se realizaron ensayos para determinar estos parámetros según las nuevas condiciones de deposición, y los resultados óptimos se obtuvieron utilizando una presión de 8 Pa para ambos metales y corrientes de 30 mA para el Au y 36 mA para el AuCu.

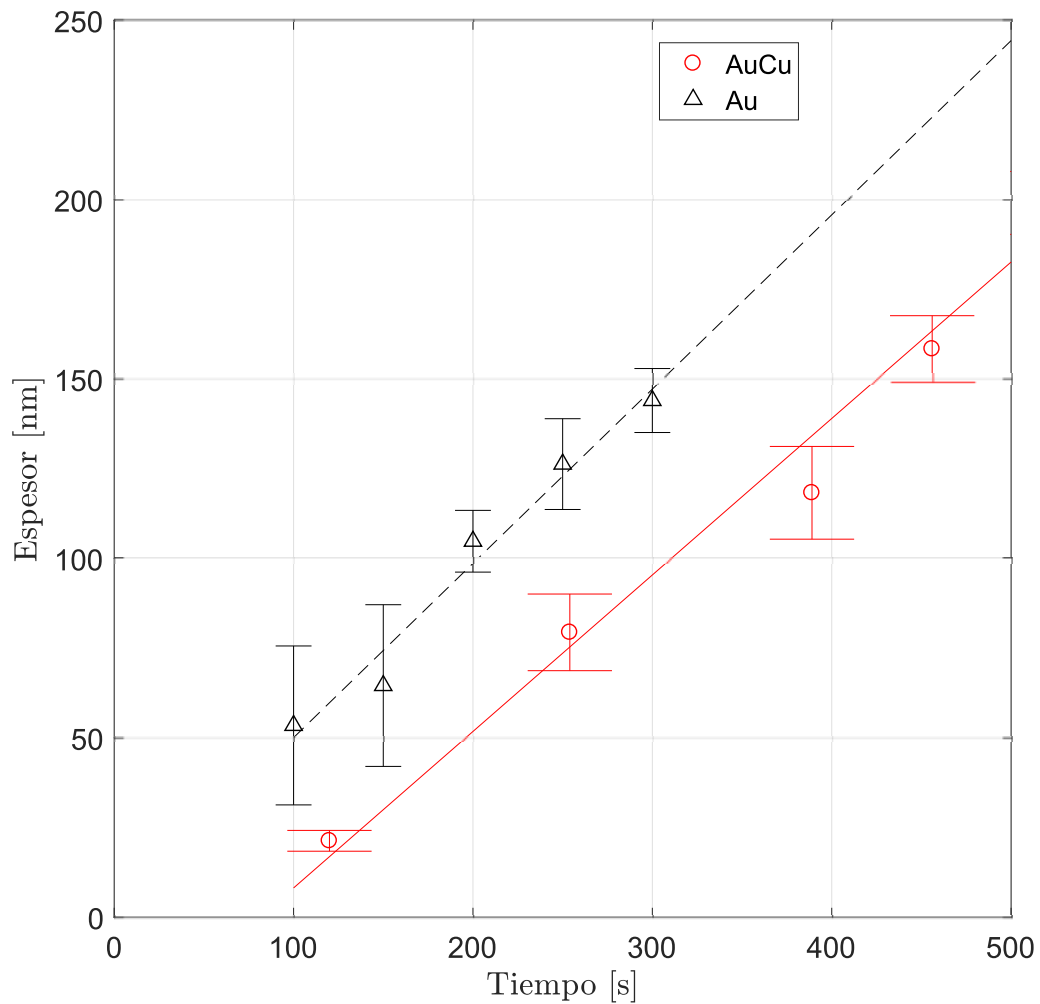
Para cada muestra, el tiempo de deposición se fijó en función del espesor deseado. Con el objeto de determinar la relación entre ambas magnitudes, es decir, la tasa de deposición, se realizaron ensayos que consistieron en el *sputtering* de cada metal (utilizando las condiciones

---

<sup>6</sup>Un magnetrón es un dispositivo que transforma energía eléctrica en energía electromagnética en forma de microondas.

<sup>7</sup>Un *o-ring* es una junta de goma de forma toroidal, que en el *plasma cleaner* se utiliza para impedir el intercambio de gases entre el interior y el exterior de la cámara de vacío (se encuentra en la unión entre la pieza fija de la cámara y la tapa desmontable de la misma, como se muestra en el Apéndice IV).

operativas óptimas descritas previamente) sobre sustratos de silicio a diferentes tiempos y una posterior medición del espesor de la capa metálica mediante un perfilómetro óptico (WYKO NT1100 Optical Profiling System, Veeco). Cada muestra se realizó por triplicado y se tomaron mediciones a lo largo de toda su superficie, ya que, en general, la deposición mediante *sputtering* no resulta homogénea en todas las direcciones. Se utilizó silicio como sustrato debido a que es opaco y la técnica de medición del espesor requiere un contraste entre la capa de metal y el sustrato. El vidrio, en cambio, es transparente y no permite la medición directa del espesor de la capa metálica con esta técnica. La Figura C.1.2 muestra los resultados experimentales y los ajustes lineales para la deposición ambos metales.



**Figura C.1.2:** Curvas de calibración para la deposición mediante *sputtering* de Au (30 mA) y AuCu (36 mA).

#### C.1.4.2. Diseño de máscaras para fotolitografía

Existen diferentes tipos de soportes estructurales para las máscaras de litografía óptica, de los cuales el más importante es la *sodalime*. Este tipo de máscaras se fabrican a partir de un sustrato cubierto con una capa de óxido de cromo (opaco), la cual es atacada con un láser de alta potencia programado para realizar una ablación de la superficie en las zonas

que deben quedar transparentes según el diseño introducido en el programa de control. Mediante este proceso pueden obtenerse fácilmente máscaras cuya distancia mínima entre elementos sea de 1  $\mu\text{m}$  o más. Estas máscaras tienen un costo elevado y existen pocos lugares en Argentina donde pueden ser obtenidas, uno de los cuales es la Sala Limpia del Centro Atómico Constituyentes. En este trabajo, las máscaras utilizadas para la fabricación del MEA W1E100 (Sección C.1.4.5.4) fueron fabricadas en dicho establecimiento<sup>8</sup>. Como alternativa a las máscaras de *sodalime*, pueden utilizarse impresiones realizadas sobre hojas de acetato, las cuales son mucho menos costosas y más fáciles de obtener. La resolución que puede lograrse con impresiones sobre acetato es, sin embargo, mucho menor que la que se obtiene mediante ablación láser en *sodalime*. No obstante, para los diseños utilizados en esta tesis resultaron de suma utilidad, ya que las dimensiones involucradas en los mismos fueron suficientemente grandes como para obtener resultados satisfactorios. Debido a que las hojas de acetato tienen un espesor muy bajo y no son rígidas, estas máscaras fueron adheridas a un soporte de vidrio antes de poder colocarlas en la máquina alineadora. Las impresiones en acetato se realizaron en la imprenta ABC Sur de la ciudad de San Carlos de Bariloche, utilizando una resolución de 1200 dpi<sup>9</sup>.

Las máscaras utilizadas en esta tesis para los procesos de fotolitografía involucrados en la fabricación de MEAs (Sección C.1.4.5) fueron diseñadas utilizando el *software* libre Inkscape y el *software* comercial L-edit<sup>10</sup>. Los formatos de exportación para la fabricación de máscaras de acetato y *sodalime* fueron *.pdf* y *.gds*, respectivamente.

### C.1.4.3. Detalles del proceso de microfabricación

En esta sección se describe en detalle, paso a paso, el proceso completo de microfabricación empleado en este trabajo para la construcción de arreglos de microelectrodos. En el Apéndice IV se presenta un protocolo que fue desarrollado con el objeto de ser utilizado como estándar en la fabricación de estos dispositivos.

En todos los MEAs fabricados en esta tesis se utilizó vidrio como material para el sustrato, debido tanto a su biocompatibilidad como a su transparencia, lo que posibilita la observación de los cultivos celulares mediante un microscopio invertido. Los sustratos fueron obtenidos a partir de portaobjetos de vidrio estándares (25 x 75 mm<sup>2</sup>), los cuales fueron cortados en tres cuadrados de aproximadamente igual tamaño (25 x 25 mm<sup>2</sup>). La operación de corte se realizó de forma manual con una punta de diamante, y en la mayoría de los casos los lados cortados no resultaron perfectamente paralelos a los lados opuestos. Estos defectos no tienen ninguna repercusión en la fabricación de los MEAs, ya que el área total abarcada por los

<sup>8</sup>La persona encargada de recibir nuestro diseño y de supervisar la concreción del pedido fue Juan Bonaparte, miembro del Departamento de Micro y Nanotecnología del Centro Atómico Constituyentes.

<sup>9</sup>1 dpi = 1 punto por pulgada.

<sup>10</sup>Este *software* está incluido en el conjunto de herramientas *Tanner*, cuya licencia se obtuvo temporalmente al realizar un curso de microfabricación en el Instituto Balseiro y se aprovechó para realizar algunos de los diseños de esta tesis.

misimos es menor que el área de los sustratos cuadrados, y en todos los casos los patrones a transferir cabían perfectamente en ellos. No obstante, los cortes se realizaron desde ambos lados del portaobjetos y se descartó siempre el cuadrado central (por poseer defectos en dos de sus lados).

En primer lugar, cada sustrato se limpia profundamente en un equipo de ultrasonido con acetona, isopropanol y agua deionizada para remover cualquier tipo de partículas que puedan estar adheridas a su superficie. Es muy importante realizar esta limpieza de forma adecuada, ya que la presencia de partículas sobre el sustrato interferiría en la deposición de la capa metálica, produciendo defectos. A continuación, los sustratos son tratados con plasma de oxígeno (Sección C.1.3.4) para remover cualquier residuo remanente (especialmente los compuestos orgánicos).

Luego de la limpieza, se procede a realizar la deposición, mediante *sputtering* (Sección C.1.3.2), de la capa metálica que forma los electrodos, pistas y pads en el producto final. Se probaron diferentes metales en esta tesis, entre ellos plata (Ag), cobre (Cu), oro (Au) y una aleación de oro y cobre (AuCu, también llamado “oro rojo”). De ellos, sólo se utilizaron Au y AuCu para la realización de experimentos, debido a su biocompatibilidad. El blanco de oro fue obtenido de la empresa Ted Pella, y poseía 99.99 % pureza. El blanco de AuCu empleado estaba compuesto por 75 % Au y 25 % Cu en masa, lo que corresponde a una relación atómica 1:1. El mismo se encontraba disponible para su uso en el Laboratorio de Bajas Temperaturas del Centro Atómico Bariloche. Se utilizaron diferentes espesores de deposición, que se describen más adelante.

Tras la deposición de la capa metálica, las muestras son limpiadas nuevamente con acetona, isopropanol y agua deionizada. El siguiente paso involucra la deposición de material fotosensible por medio de la técnica de *spin-coating* descrita previamente. La fotoresina utilizada en todos los MEAs fabricados en esta tesis fue la  $\mu$ Posit 1400-31 (fotoresina positiva), y fue seleccionada por su biocompatibilidad y disponibilidad, según las recomendaciones de Bast [26]. Esta capa de fotoresina se expone a radiación UV a través de la máscara seleccionada (Sección C.1.4.2) y el área expuesta se remueve con un revelador químico (AZ400K, solución de borato de potasio en agua). El patrón resultante de resina debe coincidir con el patrón metálico deseado.

La zona descubierta de la capa metálica es removida mediante la técnica RIE (Sección C.1.3.3) con gas argón. El comido se debe realizar de manera pulsada, como se describe en la Tabla C.1.1. Esto tiene como objetivo evitar el incremento en la temperatura de la muestra por encima de la temperatura de transición vítrea de la fotoresina [26]. El material fotosensible es resistente al plasma de Ar y protege la capa metálica en las zonas cubiertas (que forman el patrón deseado). Una vez eliminada la zona no cubierta de la capa metálica, la fotoresina es parcialmente removida utilizando acetona y ultrasonido. Es de suma importancia utilizar baja potencia en el equipo de ultrasonido (lo que puede lograrse sumergiendo el recipiente que contiene el MEA en acetona lentamente y a poca profundidad), ya que las

vibraciones intensas pueden provocar la remoción de la capa metálica. No obstante, a pesar de realizar el comido de manera pulsada, resulta en general muy difícil remover totalmente el material fotosensible con acetona, probablemente debido a cambios químicos y mecánicos ocurridos como consecuencia del incremento de temperatura. La remoción completa de la capa de fotoresina fue alcanzada únicamente mediante un tratamiento de corta duración con plasma de  $O_2$  luego de la limpieza con acetona. El producto resultante de este proceso consiste en el patrón metálico deseado depositado sobre el sustrato de vidrio.

La etapa siguiente en el proceso de microfabricación consiste en la deposición de la capa aislante, encargada de cubrir toda la superficie excepto los *pads* de conexión y los electrodos (tanto microelectrodos como contraelectrodos). El producto final consiste en un arreglo de microelectrodos, cuya cantidad y tamaño depende del MEA particular (Sección C.1.4.5), cada uno con su correspondiente pista y *pad* de conexión, y un conjunto de contraelectrodos (geometría y tamaño según MEA particular) cuyas pistas están interconectadas y terminan en *pads* de conexión. El material empleado para la capa aislante en todos los MEAs fabricados en esta tesis fue la misma resina utilizada para la fotolitografía, a saber,  $\mu$ Posit 1400-31. Este material se utilizó porque posee una conductividad eléctrica extremadamente baja y puede ser fácilmente depositado por litografía [26]. Para la deposición de esta capa de fotoresina se utilizó una segunda máscara, cuyos detalles son específicos de cada MEA (Sección C.1.4.5).

Luego de la deposición de la capa aislante, las muestras son tratadas nuevamente con plasma de  $O_2$ . Esta etapa tiene dos objetivos, uno de los cuales es la remoción de cualquier residuo de fotoresina que se encuentre sobre los electrodos y *pads*, mientras que el otro es la promoción de la adhesión celular a través del incremento en la hidrofiliidad de las superficies metálicas, como se describe en [67]. Sin embargo, debido a la naturaleza orgánica de las moléculas de fotoresina, las mismas reaccionan con el plasma de oxígeno y por lo tanto el tratamiento debe realizarse muy cuidadosamente, con el objeto de evitar la remoción de la capa aislante. Se obtuvieron muy buenos resultados exponiendo las muestras al plasma de  $O_2$  de forma pulsada como se describe en la Tabla C.1.1. Luego de este tratamiento, las muestras son esterilizadas en un horno a 260 °C durante 2 horas.

Finalmente, se montan cámaras cilíndricas en cada muestra utilizando pegamento siliconado (Fastix<sup>®</sup>), las cuales delimitan los *wells*. El número de cámaras cilíndricas y su material (vidrio o plástico), así como el área y volumen totales de los *wells* formados, dependen del MEA particular. Además, el pegado de las cámaras se realiza antes de la esterilización para *wells* de vidrio y luego de la misma para *wells* plásticos (ya que el plástico no soporta las altas temperaturas de esterilización). Previo al montaje de las cámaras, éstas son limpiadas en profundidad con agua y lavandina. Los arreglos de microelectrodos resultantes son guardados en la incubadora hasta su uso. Por medio de este procedimiento, se logró fabricar hasta tres MEAs en paralelo (independientemente de su diseño) en dos jornadas laborales (incluyendo el tiempo de secado del pegamento siliconado). La Tabla C.1.1 resume los pasos de la microfabricación junto con los parámetros más importantes involucrados en cada etapa.

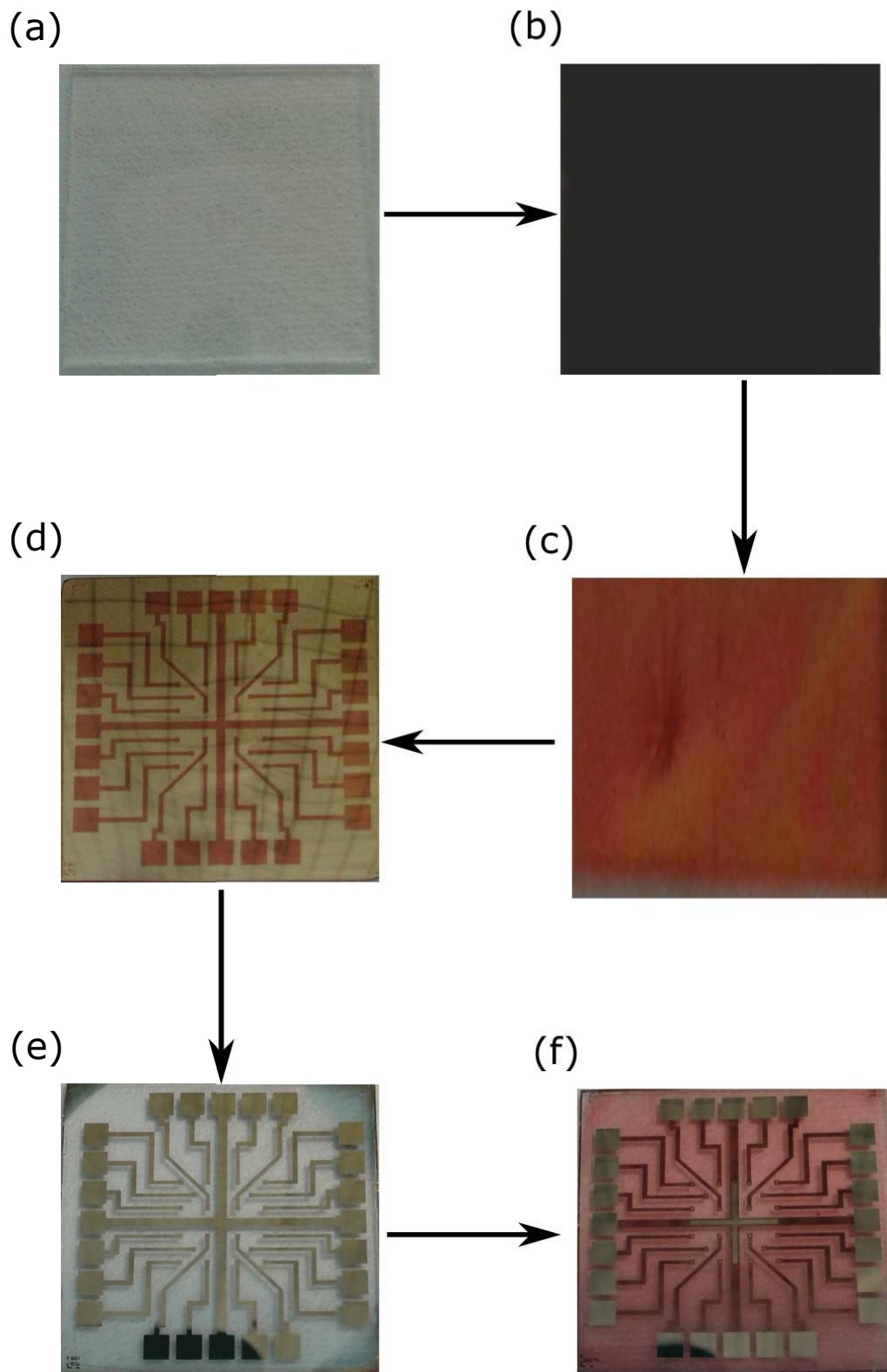
**Tabla C.1.1:** Pasos involucrados en la fabricación de los MEAs desarrollados en este trabajo. Los valores de los parámetros corresponden a las condiciones óptimas y están referidos a los equipos específicos descritos en el texto.

Paso	Descripción	Parámetros
1	Limpieza con ultrasonido	Acetona, 4 min Isopropanol, 4 min Agua deionizada, 4 min
2	Plasma O <sub>2</sub>	300 W 4 pulsos (30 s ON / 120 s OFF)
3	Sputtering	Material: AuCu/Au 36/30 mA, 8 Pa, tiempo variable
4	Limpieza con ultrasonido	Igual al paso 1
5	Primera litografía	Fotoresina: $\mu$ Posit 1400-31 Spinning: 5500 rpm, 60s, 1000 rpm/s Exposición UV: 500 W, 10 s Revelado: AZ400K (1:4), 45 s
6	Reactive Ion Etching	Gas: Ar ( $p = 5$ mtorr, $q = 10$ cm <sup>3</sup> /min) Potencia generación plasma: 300 W Potencia RF: 50 W 60 pulsos (6 s ON / 120 s OFF)
7	Limpieza con ultrasonido	Igual al paso 1
8	Plasma O <sub>2</sub>	300 W 6 pulsos (10 s ON / 60 s OFF)
9	Segunda litografía	Igual al paso 5, pero a 4500 rpm
10	Plasma O <sub>2</sub>	Igual al paso 8, pero 4 pulsos de 5 s ON

El procedimiento previamente descrito, tal y como fue desarrollado, se utilizó únicamente para la fabricación de MEAs con AuCu como material conductor. Debido a que el Au no se adhiere correctamente al vidrio, no se logró fabricar MEAs de dicho material utilizando el mismo procedimiento. Para mejorar la adhesión del Au al vidrio, se depositó primero mediante *sputtering* una capa delgada de AuCu (aproximadamente 50 nm), y luego se realizó una segunda etapa de *sputtering* donde se depositó Au sobre la capa de AuCu. De esta manera, se obtuvo MEAs mixtos de Au sobre AuCu, en los cuales la superficie activa posee únicamente átomos de Au (las células entran en contacto únicamente con dicho metal). El espesor de la capa metálica en todos los MEAs de AuCu fabricados en esta tesis fue de 100 nm, mientras que los MEAs de AuCu/Au poseían 150 nm de espesor (50 nm de AuCu + 100 nm de Au), lo cual fue logrado en base a la calibración presentada en la Sección C.1.4.1. La Figura C.1.3 muestra una serie de fotografías que representan las diferentes etapas del



proceso de microfabricación.



**Figura C.1.3:** Etapas de microfabricación de un MEA W1E20 (Sección [C.1.4.5.3](#)). Se muestra un sustrato de vidrio recién cortado (a), cubierto con una capa de AuCu (b), cubierto con una capa de AuCu y de fotoresina (c), luego del revelado de la fotoresina (d), luego de la remoción del metal mediante RIE (e) y luego de la segunda fotolitografía que define las porciones expuestas de la capa metálica (f).

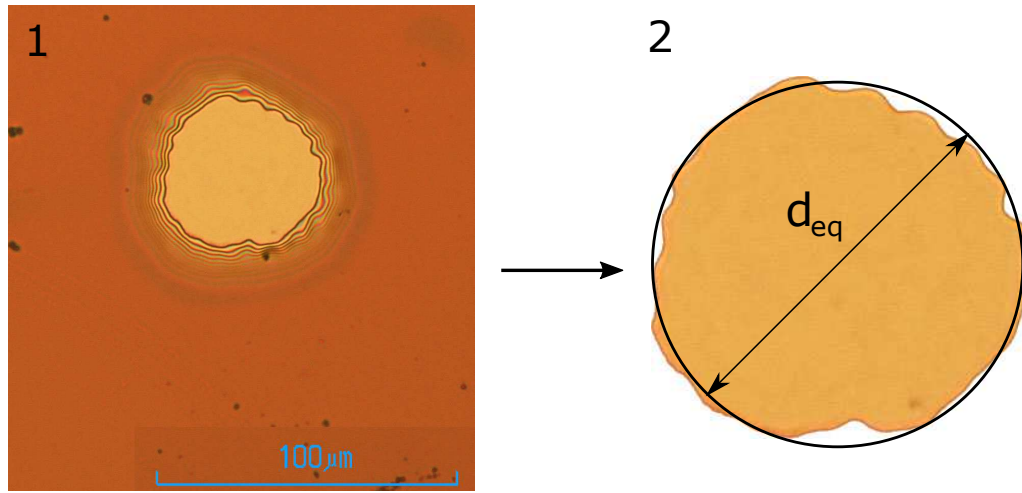


#### C.1.4.4. Determinación del área efectiva de los microelectrodos

La resolución de las máscaras de fotolitografía impresas en hojas de acetato no resultó lo suficientemente elevada como para lograr una buena definición de los electrodos de tamaño pequeño ( $< 250 \mu\text{m}$ ), y debido a esto la geometría de los mismos se apartó considerablemente de la de un círculo. No obstante, el parámetro importante a la hora de realizar mediciones con la técnica ECIS es el área expuesta, y no la geometría del electrodo. Por lo tanto, se determinó experimentalmente el área total de cada microelectrodo fabricado y, a partir de este valor, se calculó el diámetro equivalente de un microelectrodo circular.

Para determinar el área de un microelectrodo, en primer lugar se tomó una microfotografía óptica utilizando un microscopio (Eclipse 2000, Nikon) con un objetivo de 20X. A partir de esta imagen, se realizó un procesamiento digital utilizando el software Matlab®, como se muestra en la Figura C.1.4. La imagen de la izquierda muestra un microelectrodo de AuCu rodeado de resina fotosensible. Mediante un algoritmo de detección de bordes, se aisló la porción de la imagen correspondiente al microelectrodo y se determinó su área total  $A$  [68]. A partir de este valor, se modeló la geometría del electrodo como un círculo y se determinó su diámetro equivalente mediante la siguiente ecuación:

$$d_{eq} = 2 \cdot \sqrt{\frac{A}{\pi}}. \quad (\text{C.1.1})$$



**Figura C.1.4:** Determinación del área efectiva de un microelectrodo. En la figura 1 se muestra la microfotografía del microelectrodo resultante (en este ejemplo, de aproximadamente  $50 \mu\text{m}$  de diámetro), junto con una medida de referencia de  $100 \mu\text{m}$ . La figura 2 es el resultado de aplicar el algoritmo de detección de bordes mencionado en el texto, y superpuesto al microelectrodo se representa un círculo cuyo diámetro es tal que el área del mismo coincide con el área del microelectrodo.

En la Tabla C.1.2 se presentan algunos resultados obtenidos para las máscaras correspondientes al MEA W1E20 (Sección C.1.4.5.3) utilizadas en este trabajo. Se emplearon dos máscaras diferentes, con microelectrodos de  $50 \mu\text{m}$  y  $200 \mu\text{m}$  de diámetro. Las diferencias

respecto al diseño se deben a las imperfecciones causadas por la resolución relativamente baja de las impresiones en hojas de acetato. Por otro lado, las diferencias entre los diámetros de los microelectrodos fabricados y los correspondientes a las máscaras pueden explicarse teniendo en cuenta la naturaleza de la técnica de fotolitografía. En el caso ideal, la distancia entre la superficie de la máscara y la fotoresina durante la exposición es nula. No obstante, esto no ocurre en la práctica y en general existe una pequeña separación entre ambas superficies, produciéndose difracción de la luz que atraviesa la máscara [66]. Esto conduce a una mayor área expuesta, y como resultado se obtienen microelectrodos de diámetro mayor al impreso en la máscara.

**Tabla C.1.2:** Diámetro equivalente de los microelectrodos presentes en algunas de las máscaras utilizadas para fotolitografía y en los MEAs correspondientes fabricados en este trabajo. Cada muestra representa un microelectrodo contenido en un MEA de tipo W1E20 (Sección C.1.4.5.3).

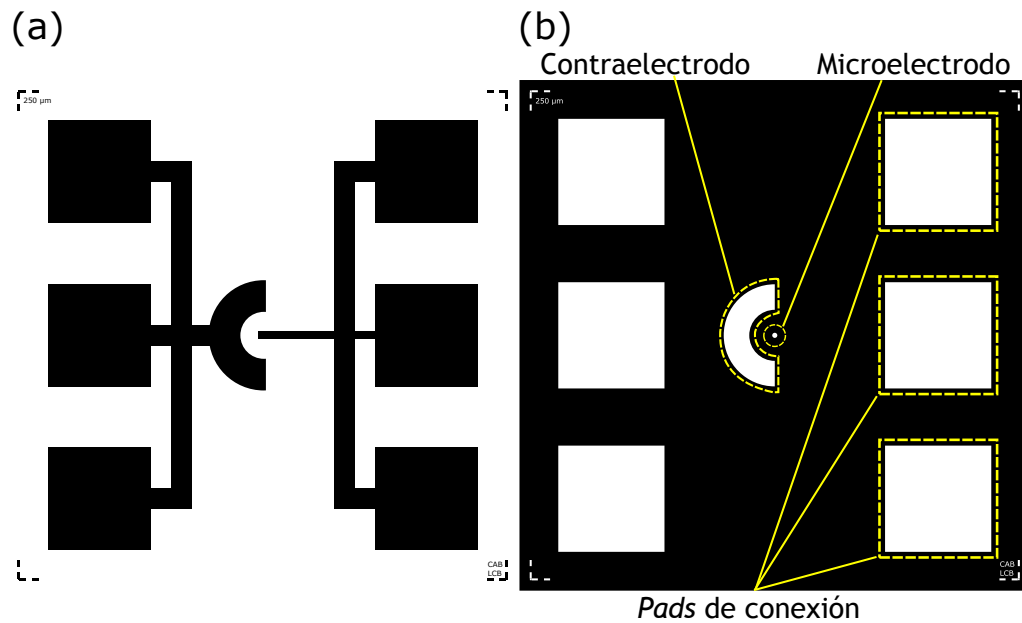
Diámetro en la máscara [ $\mu\text{m}$ ]	Diámetro en el MEA fabricado [ $\mu\text{m}$ ]	Número de muestras
$53.8 \pm 2.4$	$59.5 \pm 5.8$	102
$204.0 \pm 4.5$	$215.8 \pm 11.8$	240

#### C.1.4.5. MEAs fabricados

A continuación se detallan los tipos de MEAs fabricados en el marco de esta tesis. Los códigos utilizados para nombrar estos biosensores tienen el formato  $WxEy$ , donde  $x$  es la cantidad de *wells* presentes en un mismo MEA e  $y$  representa la cantidad de microelectrodos activos contenidos en cada *well*. Así, por ejemplo, el MEA W4E1 consiste en un cuadrado de vidrio con 4 *wells* independientes (no es posible el intercambio de líquido entre ellos), cada uno de los cuales aloja un microelectrodo activo y un contraelectrodo. En los MEAs con múltiples *wells*, los contraelectrodos están interconectados y comparten las mismas pistas y *pads*, mientras que cada microelectrodo posee su propia pista y *pad*.

##### C.1.4.5.1. W1E1

Este MEA fue el primer modelo en ser fabricado, y sirvió como base para poner a punto todas las técnicas de microfabricación y para el desarrollo posterior de MEAs más complejos. La Figura C.1.5 muestra las máscaras utilizadas para su fabricación, las cuales fueron impresas en una hoja de acetato. La figura semianular corresponde al contraelectrodo y la pista rectangular que va desde el centro del mismo hasta el *pad* central derecho constituye la base sobre la cual se delimita el microelectrodo activo en la segunda etapa de fotolitografía (Sección C.1.4.3). El contraelectrodo tiene un área de aproximadamente  $14 \text{ mm}^2$ .



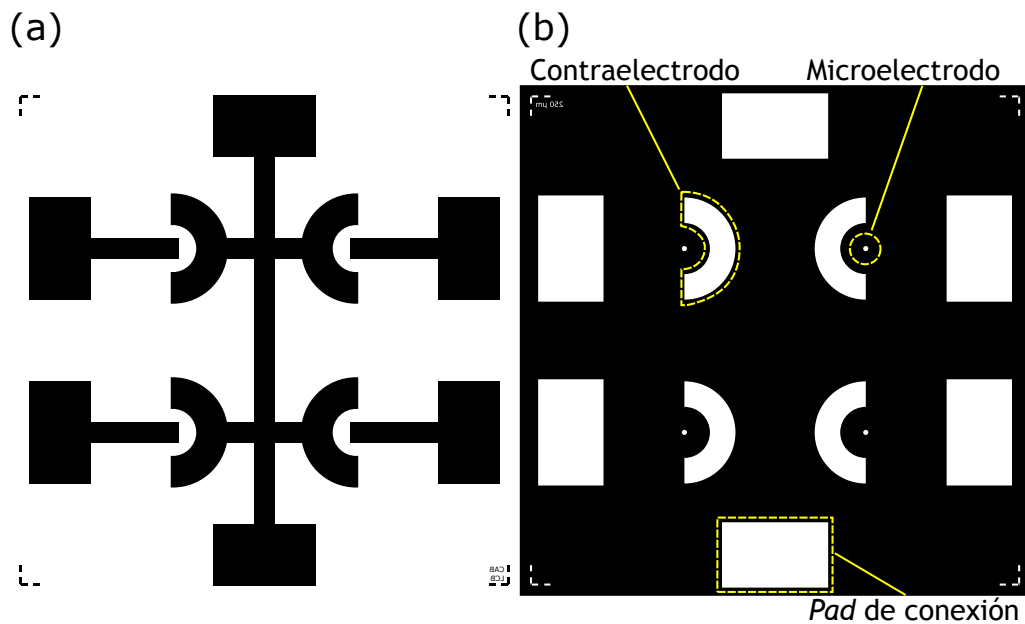
**Figura C.1.5:** Máscaras utilizadas en la fabricación del sensor W1E1. La Figura (a) corresponde a la primera etapa de fotolitografía, y las partes negras (opacas en la máscara) definen las regiones donde quedará metal depositado en el producto final. La Figura (b) corresponde a la segunda etapa de litografía, y las zonas blancas (transparentes en la máscara) definen los “agujeros” sobre la capa de fotoresina aislante, delimitando las partes de metal expuestas que corresponden al microelectrodo activo (círculo pequeño ubicado aproximadamente en el centro de la máscara), al contraelectrodo (figura semianular) y a los *pads* de conexión (cuadrados ubicados a ambos lados de la máscara). Las líneas ubicadas en los cuatro vértices de ambas máscaras son las marcas de alineación.

La primera máscara (Figura C.1.5, izquierda) está diseñada para poder ser utilizada como base en la fabricación de MEAs con microelectrodos de diferentes tamaños, los cuales están definidos en la segunda máscara. Este MEA, con un microelectrodo de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro, posee una geometría análoga a la del MW1 (Sección B.1.1.1), y la respuesta eléctrica del electrodo desnudo debe ser similar si se utiliza el mismo metal en la fabricación (Au). El diámetro interno de los *wells* es también idéntico al de los dispositivos MW1 y MW2 (6.4 mm). Las conexiones entre los dos electrodos de este MEA y los terminales correspondientes del instrumento de medición (Secciones B.1.1.2 y B.1.1.3) se realizaron con cables de tipo cocodrilo. Estos cables se conectan por presión, y son muy sencillos de colocar y quitar. Antes de realizar la conexión, se colocó una gota de pintura de plata sobre la superficie de cada *pad*, de forma tal de mejorar el contacto eléctrico y de proporcionar una mayor resistencia mecánica. Como se observa en la Figura C.1.5, existen tres *pads* de conexión para el microelectrodo y otros tres para el contraelectrodo. De esta manera, conectando un cable cocodrilo en cada *pad* se logra establecer un buen contacto eléctrico. Los terminales de los tres cables correspondientes al microelectrodo se soldaron entre sí y lo mismo se hizo con los cables del contraelectrodo. Así, se tienen dos conectores eléctricos reutilizables para este tipo de MEAs. Una fotografía de un método de conexión similar al descrito se muestra en la Figura C.1.7 para el MEA W4E1, pero en el caso mostrado hay un único *pad* por cada

microelectrodo (y por lo tanto los cables cocodrilo no están soldados entre sí y cada uno representa una salida eléctrica independiente).

#### C.1.4.5.2. W4E1

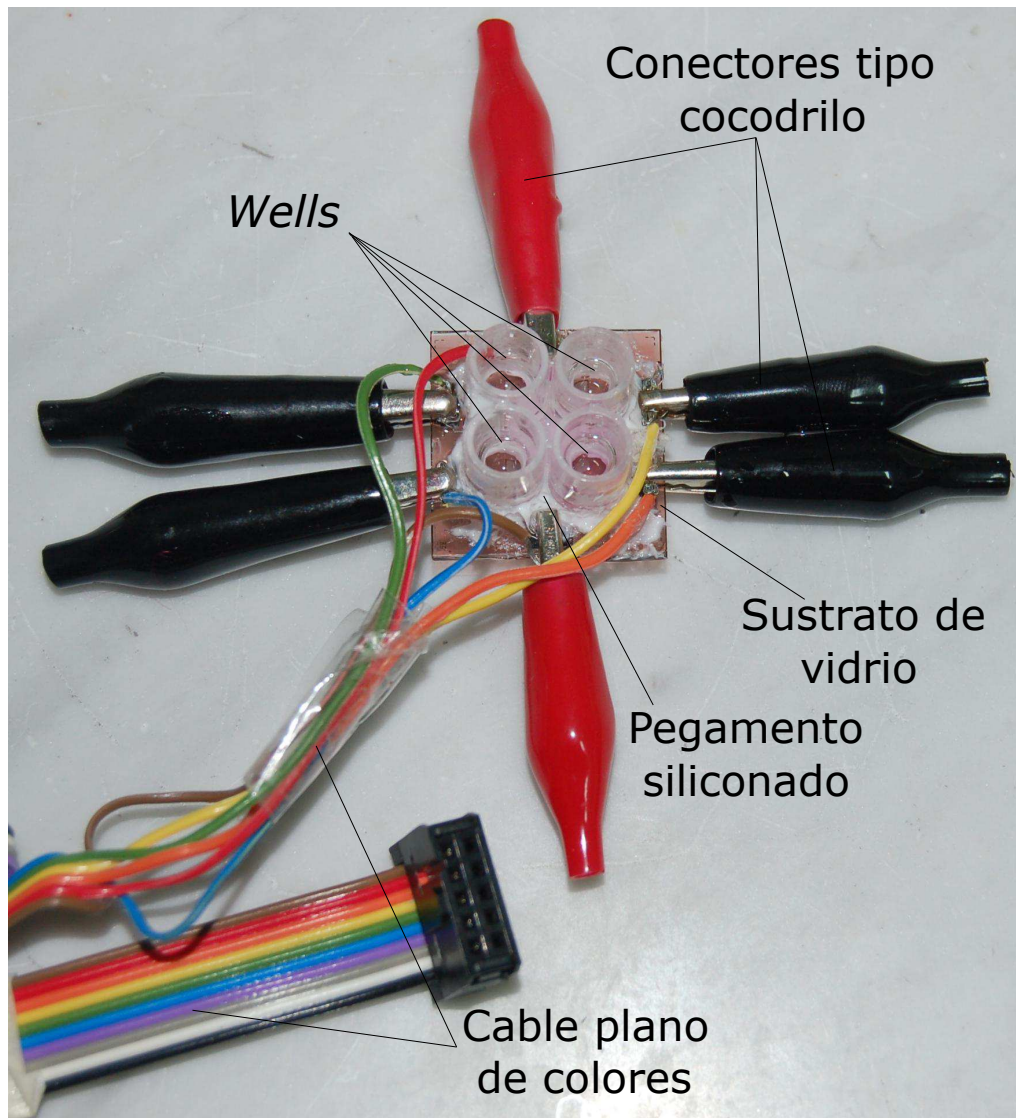
Ésta es una versión mejorada del W1E1, en la cual se optimizó el uso de la superficie total del sustrato de manera tal de poder realizar la producción más eficientemente (mayor cantidad de *wells* en el mismo tiempo total de fabricación). Este arreglo consiste en 4 *wells* independientes, cada uno con un microelectrodo y un contraelectrodo idénticos a los presentes en el W1E1. Cada *well* está delimitado por un cilindro plástico de 6.4 mm de diámetro interno, y los 4 cilindros se encuentran adheridos entre sí. Cada microelectrodo tiene una pista que termina en un *pad* de conexión, y todos los contraelectrodos están interconectados mediante una pista central que termina en dos *pads* ubicados en extremos opuestos del sustrato. Las máscaras utilizadas para la fabricación de este MEA, que fueron impresas en una hoja de acetato, se muestran en la Figura C.1.6.



**Figura C.1.6:** Máscaras utilizadas en la fabricación del sensor W4E1. La Figura (a) corresponde a la primera etapa de fotolitografía, y la figura (b) a la segunda. Cada uno de los 4 microelectrodos tiene su propia pista y un único *pad* de conexión. Los contraelectrodos semianulares están interconectados mediante la pista central que termina en dos *pads* de conexión.

La conexión entre estos electrodos y los diferentes instrumentos de medición se efectuó de manera análoga al MEA W1E1. En este caso, sin embargo, cada microelectrodo posee un único *pad* de conexión, y los conectores tipo cocodrilo se utilizaron para apretar los cables contra la superficie de los *pads*. Nuevamente, se agregó una gota de pintura de plata sobre cada *pad* antes de realizar la conexión. Los cables utilizados provienen de un cable plano de colores, que posee un conector con 8 salidas hembra para pines estándares, de las cuales

se utilizaron sólo 6 (2 para los contraelectrodos y 4 para los microelectrodos). Un conector macho análogo se utilizó para cerrar el circuito entre este MEA y cualquiera de los sistemas de medición descritos en la Sección B.1.1, a través del circuito selector de canales. Este sensor resultó muy práctico a la hora de realizar experimentos de forma secuencial, ya que en cada *chip* es posible utilizar, por ejemplo, tres *wells* para la realización de un mismo experimento con células y dejar uno con medio de cultivo y sin células a modo de control. La Figura C.1.7 muestra una fotografía del MEA terminado junto con las conexiones correspondientes.



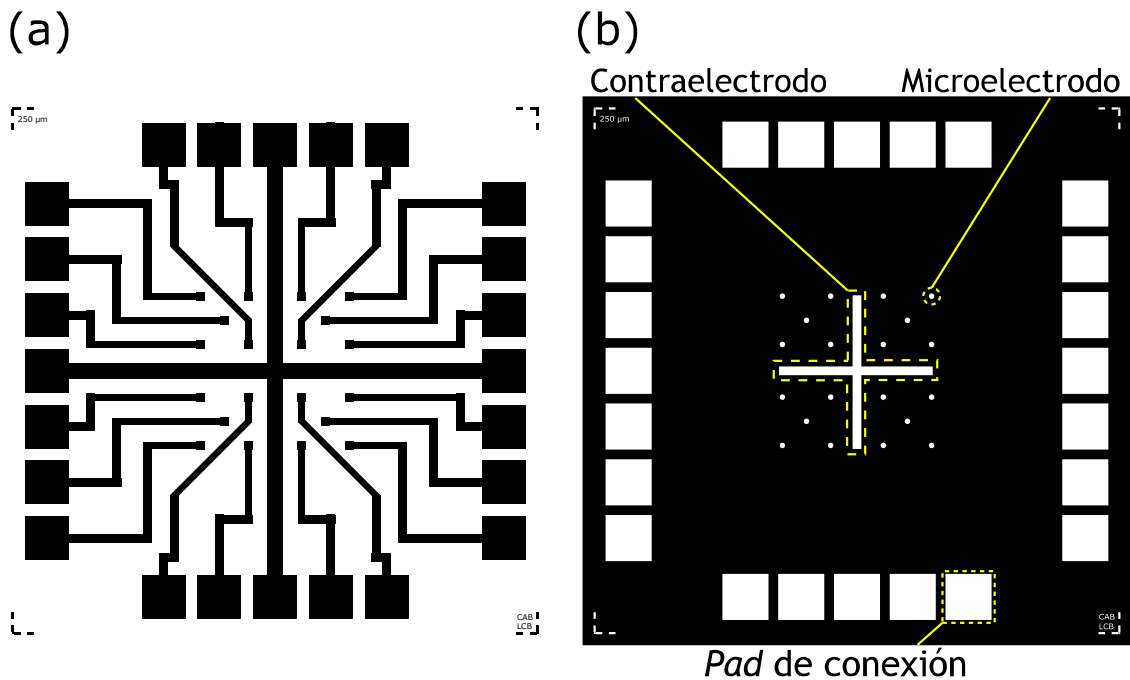
**Figura C.1.7:** Fotografía un MEA W4E1 terminado, junto con sus conexiones eléctricas.

Estos sensores, al igual que los W1E1, poseen un único microelectrodo por cada *well* y, por lo tanto, no cumplen con los requisitos necesarios para poder ser utilizados en la realización de experimentos con cultivos mixtos de células normales y cancerosas. Sin embargo, resultaron de mucha utilidad para experimentar con los valores de los diferentes parámetros mencionados en la Tabla C.1.1 hasta alcanzar las condiciones óptimas de fabricación.

Además, sirvieron como base para el estudio del AuCu como potencial material para aplicaciones en mediciones de bioimpedancia.

#### C.1.4.5.3. W1E20

Este MEA fue específicamente diseñado para la realización de experimentos con cultivos mixtos de células normales y cancerosas. Posee un único *well* con un total de 20 microelectrodos activos, los cuales se encuentran distribuidos en cuatro cuadrantes. Cada uno de estos cuadrantes posee 5 microelectrodos dispuestos formando un cuadrado, con 4 de ellos en los vértices y uno en el centro. El sensor posee un único contraelectrodo con forma de signo de suma (+), cuyo centro coincide con el centro del arreglo. Las dimensiones del contraelectrodo se seleccionaron de forma tal que  $A_c \geq 300A_a$ , donde  $A_a$  es el área de un microelectrodo y  $A_c$  es el área del contraelectrodo. Cada microelectrodo posee su propia pista y *pad*, y el contraelectrodo termina en 4 *pads* de conexión ubicados cada uno en el centro de uno de los lados del sustrato. La Figura C.1.8 muestra las máscaras utilizadas en su fabricación, que fueron impresas en una hoja de acetato. Debido a que los microelectrodos se disponen en este caso sobre un área mayor en comparación con los MEAs anteriormente descritos, el diámetro interno del *well* en un MEA W1E20 es de 11.5 mm.



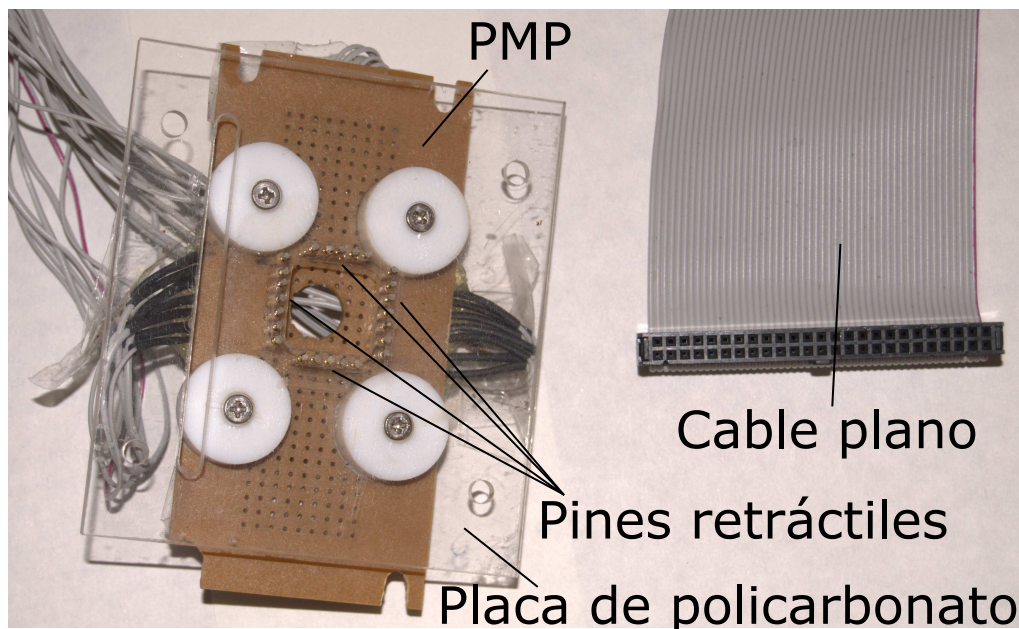
**Figura C.1.8:** Máscaras utilizadas en la fabricación del sensor W1E20. La Figura (a) corresponde a la primera etapa de fotolitografía, y la figura (b) a la segunda. Los 20 microelectrodos están distribuidos equitativamente en 4 cuadrantes. A su vez, en cada cuadrante los microelectrodos están dispuestos sobre un cuadrado, con 4 de ellos en los vértices y uno en el centro. Existe un único contraelectrodo con forma de signo de suma (+) ubicado en el centro del sensor y conectado a 4 *pads* de conexión.

La conexión entre los *pads* de este MEA y los diferentes instrumentos de medición se

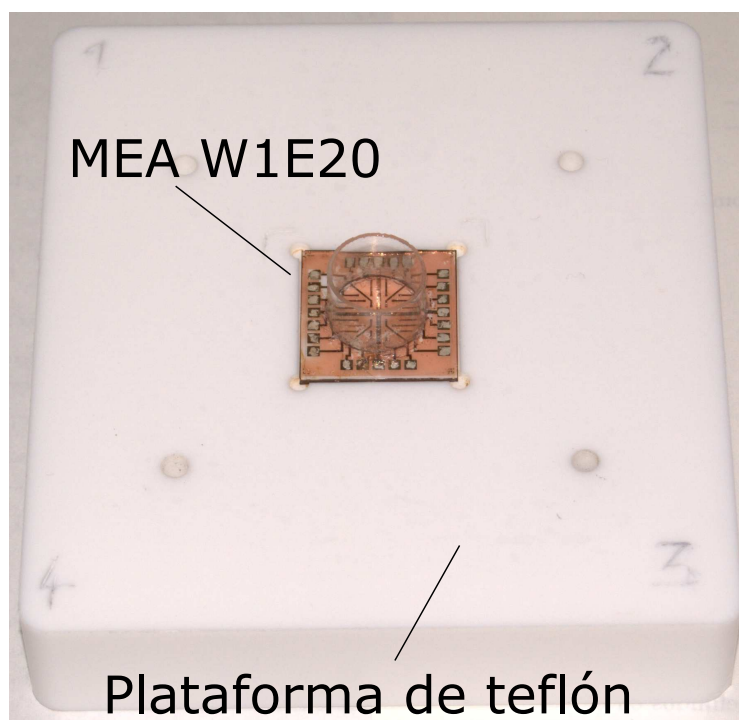


realizó por medio de un soporte que fue diseñado y fabricado con ese propósito. El mismo consiste en un conjunto de pines retráctiles (*Spring Loaded Pins w/ Star Tip*, P75-LM) soldados a una placa de matriz de puntos (PMP) que posee cuatro agujeros en los vértices para poder atornillarla a la base y así aplicar una presión uniforme entre los pines y los *pads*. La misma se encuentra unida mediante tornillos a una placa de policarbonato, como se muestra en la Figura C.1.9. Una serie de pistas delineadas en la PMP conducen las señales desde los pines retráctiles hacia 24 cables que constituyen los canales de salida del sensor (Figuras C.1.9 y C.1.11). Estos cables provienen de un cable plano de 50 terminales (de los cuales sólo se utilizan 24), cuyo extremo tipo hembra se ubica fuera de la incubadora para poder ser conectado al instrumental de medición, cerrando el circuito. Tanto la PMP como la placa de policarbonato poseen un agujero en el centro, cuya área es ligeramente mayor al área del *well*, permitiendo su inserción. El MEA se apoya sobre una plataforma de teflón que posee una ligera depresión en su centro, cuya geometría y dimensiones coinciden aproximadamente con la del MEA, permitiendo su sujeción para la posterior alineación de los pines retráctiles con los *pads* (Figura C.1.10), la cual se realiza de forma manual. Al igual que en los sensores descritos anteriormente, se coloca una gota de pintura de plata en los *pads* antes de realizar la conexión, con el objeto de lograr un mejor contacto eléctrico.

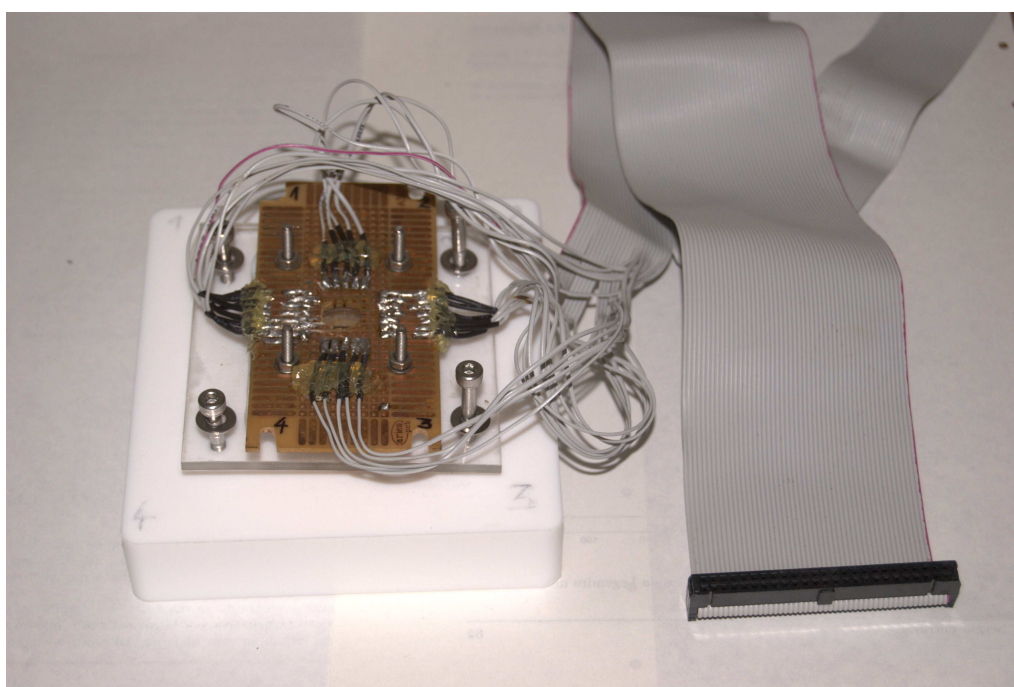
Con este MEA es posible realizar mediciones de espectros de impedancia en diferentes regiones del cultivo celular, y por lo tanto es adecuado para experimentos de discriminación en cultivos mixtos (Capítulo C.2).



**Figura C.1.9:** Fotografía del conector utilizado para el W1E20.



**Figura C.1.10:** Fotografía de la plataforma de teflón utilizada para sujetar el MEA W1E20.



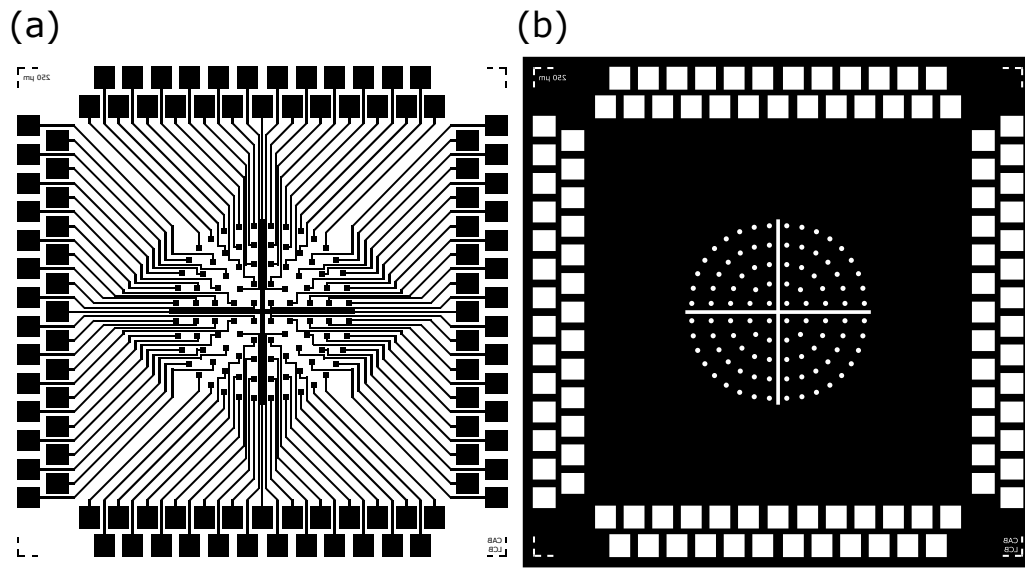
**Figura C.1.11:** Fotografía un MEA W1E20 terminado e instalado, listo para su uso.

#### C.1.4.5.4. W1E100

Finalmente, se diseñó una extensión del MEA W1E20 que contiene 100 microelectrodos activos en un único *well*. Los mismos se encuentran dispuestos sobre circunferencias



concéntricas y equiespaciados sobre las mismas, como se muestra en la Figura C.1.12. Nuevamente, el único contraelectrodo existente tiene forma de signo de suma y está ubicado en el centro del arreglo. El criterio de diseño de las dimensiones del contraelectrodo fue el mismo que en el W1E20. Debido a que la distancia entre microelectrodos es en este caso muy pequeña, el tamaño de las pistas se vio significativamente reducido en comparación con los otros MEAs. Esto hizo necesario fabricar máscaras con una resolución mayor a la que puede ser obtenida con impresiones en hojas de acetato, y por ello las mismas fueron fabricadas en *sodalime* mediante ablación láser.



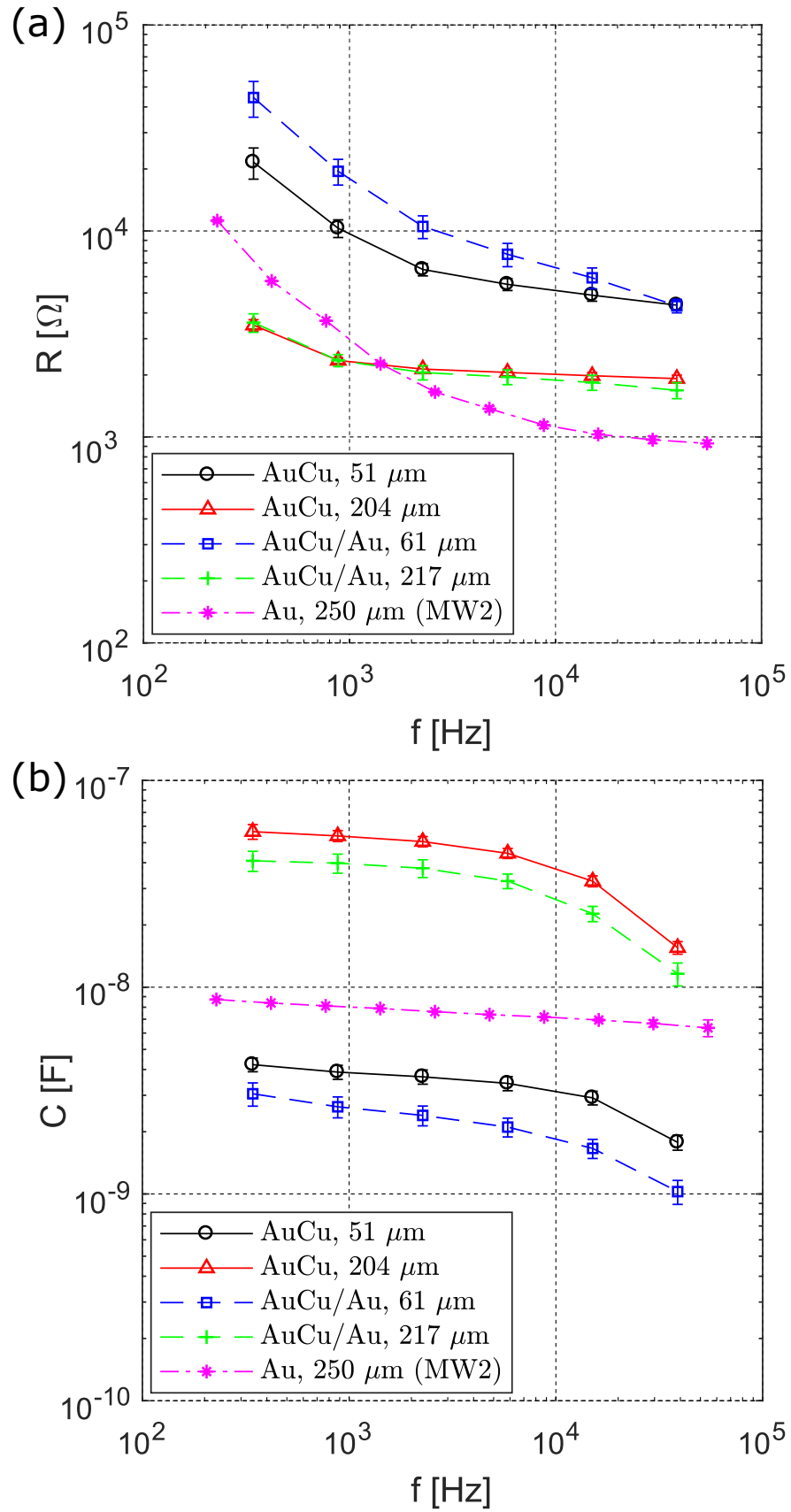
**Figura C.1.12:** Máscaras utilizadas en la fabricación del MEA W1E100. La Figura (a) corresponde a la primera etapa de fotolitografía, y la Figura (b) a la segunda. Los 100 microelectrodos están distribuidos en circunferencias concéntricas de forma equiespaciada (midiendo las distancias sobre las circunferencias). Existe un único contraelectrodo con forma de signo de suma (+) ubicado en el centro del sensor y conectado a 4 *pads* de conexión. Los *pads* están dispuestos en dos filas a lo largo de cada lado del sustrato.

Este sensor, al igual que el W1E20, tiene aplicaciones inmediatas en experimentos de discriminación en cultivos mixtos, pero con una resolución espacial mucho mayor. No obstante, este MEA fue diseñado y fabricado sobre el final de este trabajo, y no se lo utilizó para la realización de experimentos en cultivos celulares.

## C.1.5. Resultados experimentales

### C.1.5.1. Electrodo desnudos

La Figura C.1.13 muestra los espectros de resistencia y capacidad de algunos MEAs fabricados en este trabajo y de un MEA comercial. Se presentan resultados en AuCu y AuCu/Au para dos tamaños diferentes de microelectrodo, junto con valores correspondientes al MW2 (Sección B.1.1.1).



**Figura C.1.13:** (a) Resistencia y (b) capacidad de microelectrodos desnudos de AuCu y AuCu/Au, fabricados según la metodología descrita en la Sección C.1.4.3, para dos diámetros diferentes. Además, se presentan valores correspondientes al MEA comercial MW2 (Au, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro). La curva correspondiente al MW2 se obtuvo promediando mediciones de 35 microelectrodos diferentes, mientras que las demás curvas se obtuvieron a partir de 20 microelectrodos diferentes. Las barras de error representan el desvío estándar.

Como muestra la figura, los valores de resistencia y capacidad de los microelectrodos desnudos dependen fuertemente del tamaño de los mismos y del material utilizado en su construcción. En el caso de la resistencia equivalente, se observa un incremento de la misma a medida que disminuye el tamaño del microelectrodo. Esto se corresponde con el modelo del electrodo desnudo planteado para este tipo de sistemas [25], en el que la resistencia de constricción (valor asintótico a muy altas frecuencias) es inversamente proporcional al diámetro del microelectrodo. En el caso de la capacidad equivalente, por el contrario, la misma es proporcional al área del microelectrodo y debido a esto disminuye con el cuadrado de su diámetro.

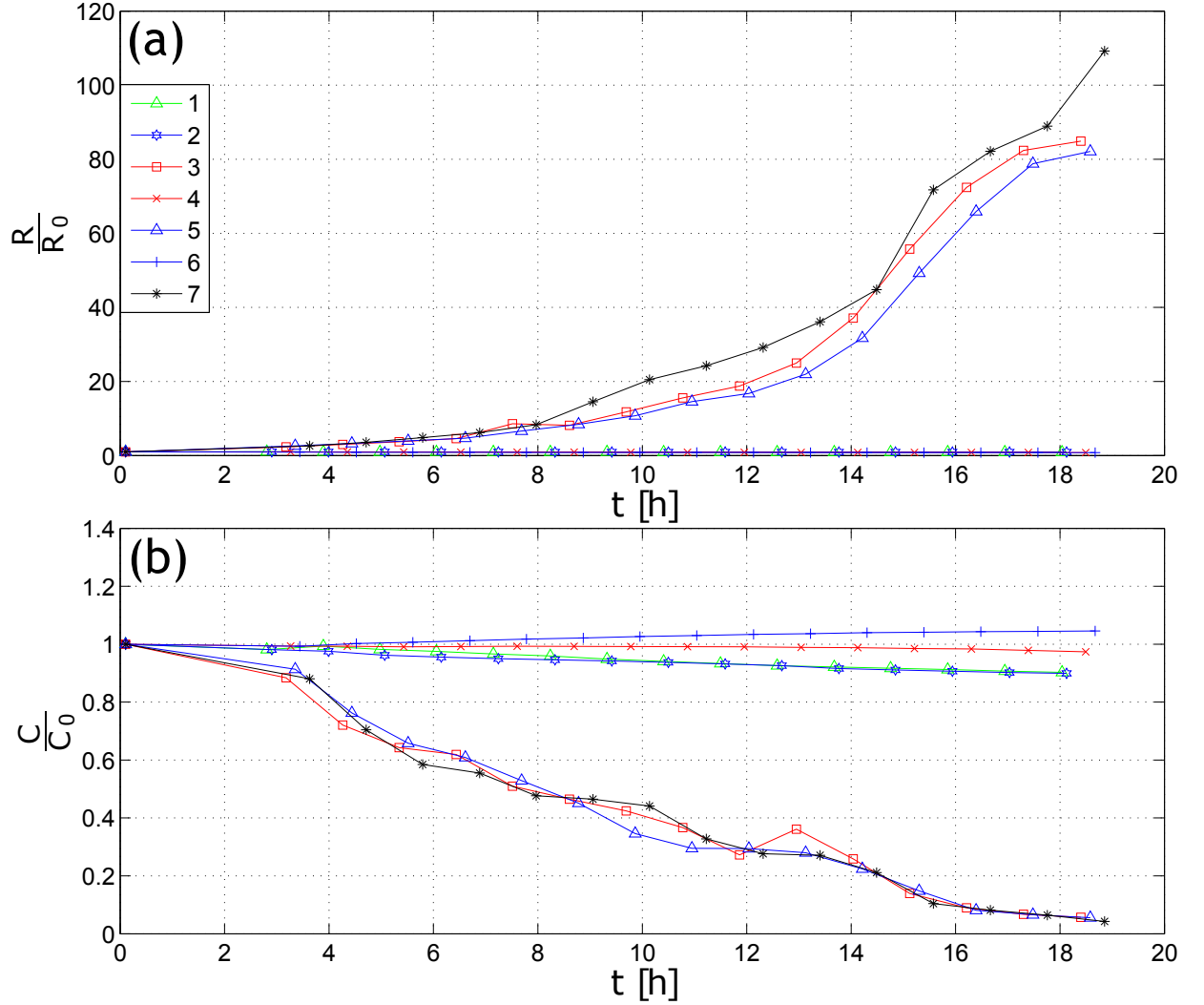
Con respecto al material de los microelectrodos, se observa que la presencia de Cu en los mismos tiene el efecto de reducir su impedancia, incrementando su capacidad en todo el espectro y reduciendo su resistencia a bajas frecuencias. Esto puede observarse comparando los microelectrodos de AuCu/Au con aquellos que poseen únicamente AuCu (y, por lo tanto, mayor proporción de Cu). En efecto, los microelectrodos de AuCu de 51  $\mu\text{m}$  de diámetro poseen mayor capacidad y menor resistencia que los de AuCu/Au de 61  $\mu\text{m}$ , lo que parecería estar en contradicción con lo expresado en el párrafo anterior (donde se analizó únicamente el tamaño, independientemente del material), y lo mismo ocurre con los electrodos de mayor diámetro para ambos materiales. Esto es aún más notorio al comparar cualquiera de estos materiales con el Au puro (presente en el MW2). La capacidad de los microelectrodos de Au puro y 250  $\mu\text{m}$  de diámetro es significativamente menor que la correspondiente a microelectrodos de AuCu de 204  $\mu\text{m}$  de diámetro, y lo recíproco ocurre con la resistencia a bajas frecuencias. El efecto de reducción de la impedancia causado por el Cu en las mediciones con células se analiza más detalladamente en la siguiente sección.

### C.1.5.2. Mediciones de referencia en cultivos celulares

Para cada uno de los MEAs desarrollados en esta tesis se realizaron mediciones de espectros de impedancia con y sin células, las cuales permitieron ajustar los parámetros involucrados en su fabricación de forma tal de obtener resultados reproducibles. De todas estas mediciones, en esta sección se presentan únicamente las que involucran el estudio de un nuevo material, a saber, la aleación AuCu descrita en la Sección C.1.4.3. No se han encontrado publicaciones previas que reporten el uso de este material en mediciones de cultivos celulares mediante ECIS, y por lo tanto los resultados aquí obtenidos tienen relevancia en el campo de aplicación de dicha técnica. En los siguientes capítulos se presentan resultados experimentales obtenidos con otros MEAs.

Las mediciones que se presentan a continuación fueron realizadas en células MDCK utilizando el esquema de medición ECIS estándar (Sección B.1.1.2). Se utilizó una constante de tiempo de 1 s para los filtros PRE y POST del *lock-in*, y se midieron 15 frecuencias logarítmicamente separadas entre 20 Hz y 100 kHz. Las Figuras C.1.14(a) y C.1.14(b) muestran la

evolución temporal de la resistencia (a 419 Hz) y capacidad (a 100 kHz) normalizadas, respectivamente, de 7 microelectrodos de AuCu de 247  $\mu\text{m}$  de diámetro contenidos en 2 MEAs de tipo W4E1. Tres de ellos fueron inoculados con células MDCK en  $t \approx 2$  h, mientras que los otros cuatro se mantuvieron desnudos.

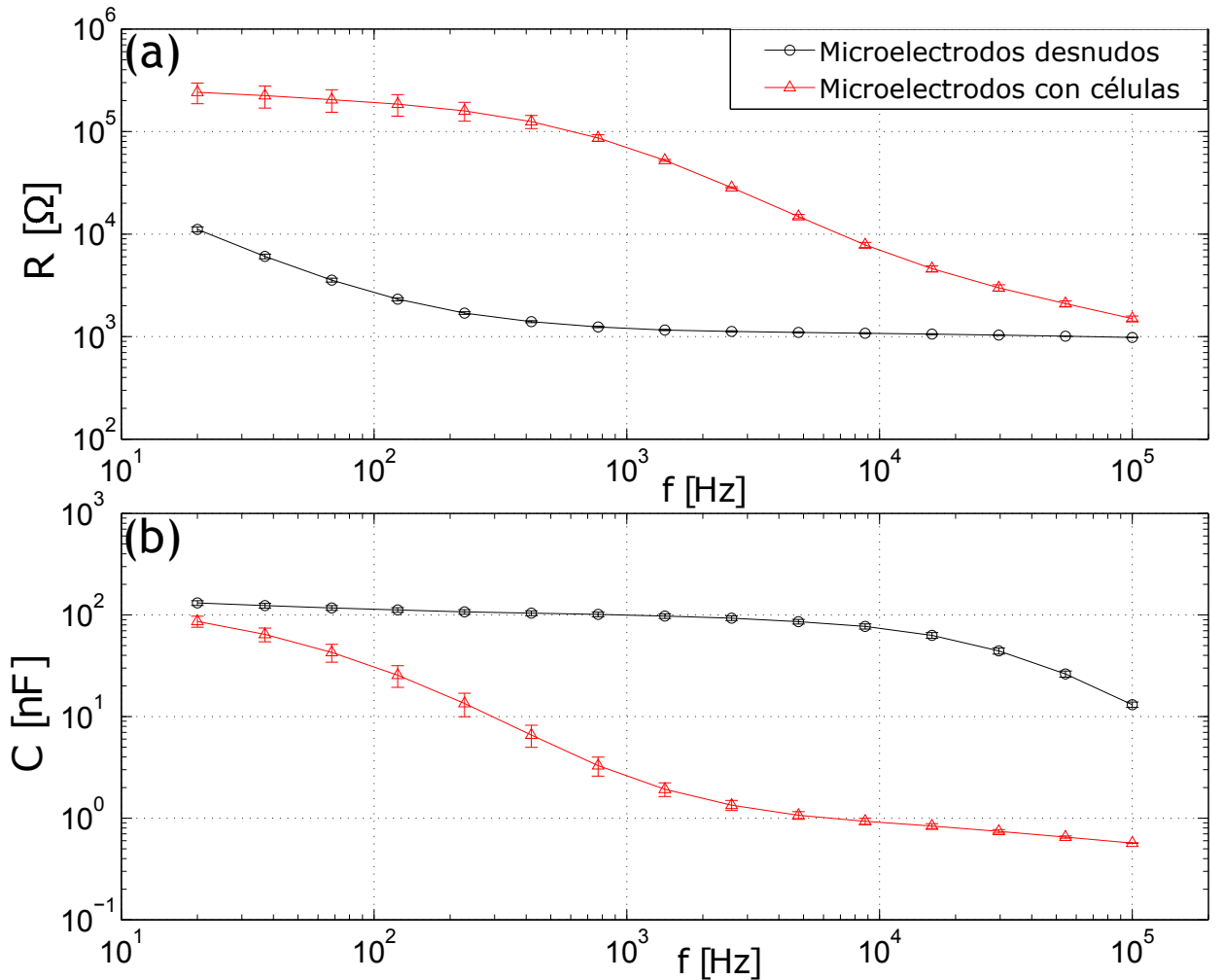


**Figura C.1.14:** Evolución temporal de la resistencia (a) y capacidad (b) de 7 electrodos de AuCu medidas a 419 Hz y 100 kHz, respectivamente, y divididas por los valores iniciales ( $t = 0$ ). En  $t \approx 2$  h, se inocularon células MDCK en los electrodos 3, 5 y 7, mientras que los demás se mantuvieron sin células en todo el experimento. El diámetro de los microelectrodos fue de  $247.4 \pm 3.1 \mu\text{m}$ .

A medida que las células se adhieren a la superficie, migran y se extienden, la resistencia medida aumenta y la capacidad disminuye, lo cual está en concordancia con resultados de trabajos previos [11, 13, 27, 69]. Como puede apreciarse, tanto la resistencia como la capacidad de los microelectrodos con células cambiaron según lo esperado, mientras que los microelectrodos desnudos no mostraron cambios apreciables, lo que indica que éstos son estables en contacto con medio de cultivo. La señal medida en los microelectrodos con células alcanzó un estado estacionario correspondiente a la confluencia aproximadamente 20 horas luego de la siembra, presentando luego sólo ligeras fluctuaciones debido al micromovimiento

(no mostrado en la figura), que es un fenómeno característico de cultivos de células vivas [27], como se explicó en la Sección A.2.4.

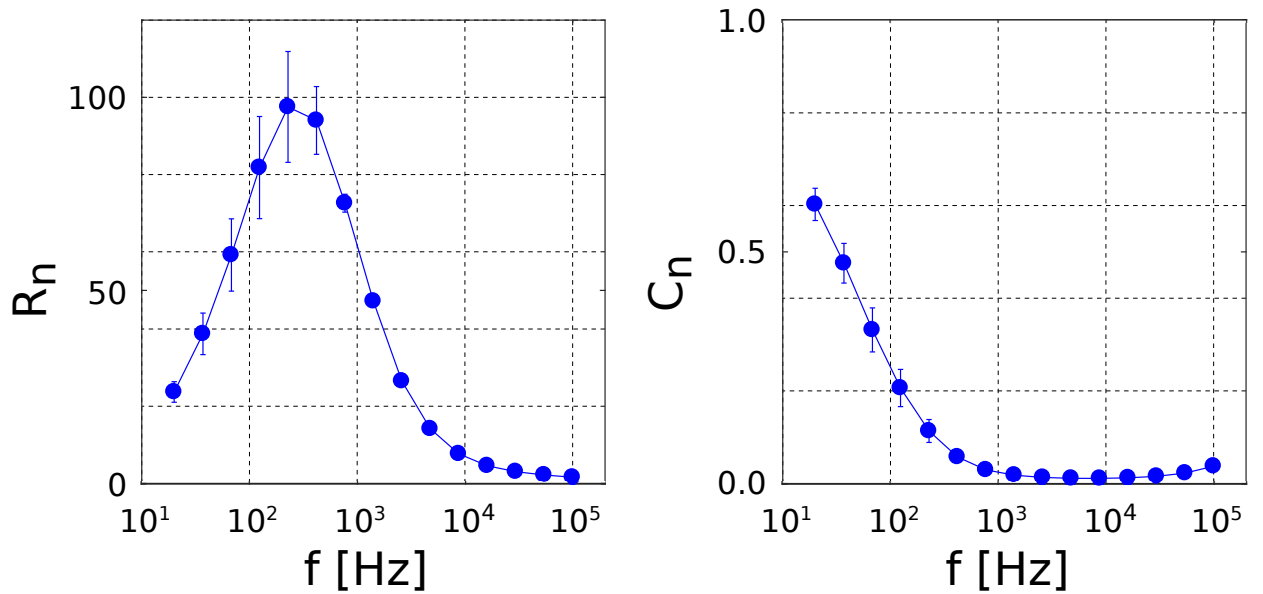
La respuesta espectral de los microelectrodos cubiertos con células en estado de confluencia brinda información acerca de las propiedades biológicas del cultivo [11]. En la Figura C.1.15, la resistencia y capacidad promedio de una serie de mediciones se grafican en función de la frecuencia, con escala logarítmica en ambos ejes, para microelectrodos desnudos y cubiertos con monocapas de células MDCK en el estado confluyente. Estas respuestas espectrales son similares en forma a aquellas obtenidas en trabajos previos con células MDCK y microelectrodos comerciales de Au [11, 13, 69]. Sin embargo, la resistencia de los microelectrodos desnudos de AuCu fabricados resultó significativamente menor, a bajas frecuencias, que la correspondiente a dichos electrodos comerciales de Au, y lo opuesto ocurrió con los valores de capacidad. Esto podría atribuirse a la interacción entre el medio de cultivo y los diferentes materiales involucrados, además del hecho de que el Cu es un mejor conductor eléctrico que el Au.



**Figura C.1.15:** Promedio de la resistencia (a) y capacidad (b) de electrodos de AuCu libres de células (círculos negros, 15 muestras) y cubiertos con células MDCK en estado confluyente (triángulos rojos, 7 muestras). Las barras de error representan el error estándar.

Un resultado interesante se obtuvo al medir la resistencia de los microelectrodos cubiertos con células en el estado de confluencia. La Figura C.1.15(a) muestra que el incremento en la resistencia del sistema debido a la presencia de células MDCK es significativamente mayor en el rango de frecuencias comprendido entre 100 y 1000 Hz. Esto puede observarse más claramente graficando el espectro de resistencia normalizada, es decir, la resistencia del microelectrodo cubierto dividida por la resistencia del microelectrodo desnudo para cada frecuencia. Esto se muestra en la Figura C.1.16, donde también se grafica el espectro de capacidad normalizada. Como puede apreciarse, los biosensores de AuCu fabricados poseen una alta sensibilidad, con valores de resistencia normalizada máxima entre 80 y 115 a frecuencias entre 200 y 500 Hz. Estos valores son mucho mayores que los obtenidos en trabajos anteriores con microelectrodos de Au de 250  $\mu\text{m}$ , donde la resistencia normalizada máxima se encontró entre 700 y 4000 Hz y cuyos valores oscilaron entre 10 y 15 [11, 13, 69]. Además, los valores de capacidad normalizada mínima, cercanos a  $10^{-2}$  a aproximadamente 5 kHz, son menores a los registrados con MEAs comerciales de Au, donde dicho valor es de aproximadamente 0,2.

El hecho de que la resistencia normalizada máxima aparezca a menores frecuencias en los microelectrodos fabricados de AuCu indicaría que que las células MDCK se ubican mucho más cerca del sustrato y/o que forman monocapas más estrechas sobre estos microelectrodos (es decir, presentan *tight junctions* más fuertes) [11]. Esto último también explicaría los elevados valores máximos obtenidos.



**Figura C.1.16:** Resistencia y capacidad promedio, normalizadas, de 7 microelectrodos de AuCu cubiertos con una monocapa de células MDCK en el estado estacionario. Las barras de error representan el error estándar.

Todos los cultivos de células MDCK sobre microelectrodos de AuCu mostraron una disminución de los valores de impedancia, asociados al desprendimiento de la monocapa celular, luego de 3 ~ 4 días desde la siembra. En electrodos comerciales de Au, este fenómeno se ha

observado en tiempos mucho mayores (hasta 14 días [9]). Esto indicaría que el AuCu es un material menos biocompatible que el Au. No obstante, todos los experimentos realizados en esta tesis tienen una duración menor a 3 días, con lo cual la biocompatibilidad de los electrodos de AuCu resulta aceptable. Además de este material, se realizaron experimentos con 4 microelectrodos únicamente de cobre, pero no se observó un crecimiento celular satisfactorio y por lo tanto se descartó dicho elemento como potencial material de fabricación.

## C.1.6. Conclusiones

Se logró poner a punto las técnicas de microfabricación empleadas en la producción de MEAs para su aplicación en mediciones de impedancia de cultivos celulares. Para ello, se partió de un trabajo previo [26] y se realizaron modificaciones tanto en las técnicas como en los valores de los parámetros involucrados en ellas y en los materiales utilizados, hasta alcanzar un conjunto de condiciones óptimas de fabricación, las cuales se resumen en la Tabla C.1.1.

Se diseñaron y construyeron diferentes tipos de biosensores (Sección C.1.4.5). Los MEAs W1E1 y W4E1 poseen un único microelectrodo en cada *well* y se utilizaron para optimizar el procedimiento de microfabricación y para evaluar un nuevo material de fabricación: el AuCu. Los sensores W1E20 y W1E100 poseen más de un microelectrodo en cada *well* y fueron diseñados para su aplicación en experimentos de discriminación entre células normales y cancerosas en cultivos mixtos, ya que poseen resolución espacial (es decir que permiten realizar mediciones sobre diferentes porciones de un mismo cultivo).

Finalmente, se presentaron los resultados de pruebas realizadas con MEAs fabricados con AuCu. Los microelectrodos correspondientes mostraron estabilidad (en términos de la impedancia medida) al ponerlos en contacto con medio de cultivo, y su respuesta espectral resultó similar en forma a la de los microelectrodos de Au comerciales, con menores valores de resistencia a baja frecuencia y mayores valores de capacidad en todo el espectro. Se logró cultivar exitosamente células MDCK sobre estos microelectrodos y su crecimiento fue monitoreado mediante espectroscopia de impedancia eléctrica celular. Los resultados fueron satisfactorios en términos de biocompatibilidad para mediciones de corta duración (menor a 3 días), y están en concordancia con trabajos previos realizados con microelectrodos de Au comerciales. La máxima sensibilidad de estos MEAs con células MDCK se encontró a frecuencias entre 200 y 500 Hz, con valores de resistencia normalizada máxima entre 80 y 115. Además, se registraron valores de capacidad normalizada mínima cercanos a  $10^{-2}$  aproximadamente a 5 kHz.

## Capítulo C.2

# Detección de células cancerosas en cultivos mixtos

### C.2.1. Resumen

Aquí se propone una aplicación de la técnica de discriminación desarrollada en el Capítulo B.3 para la detección de células cancerosas en cultivos mixtos de células normales y cancerosas. Las mediciones se llevaron a cabo empleando MEAs con resolución espacial diseñados y fabricados en el marco de esta tesis, y se ensayaron dos tamaños diferentes de microelectrodos, a saber,  $200\ \mu\text{m}$  y  $50\ \mu\text{m}$ . En primer lugar, se realizaron cultivos individuales de ambas líneas celulares para determinar el vector discriminante  $\mathbf{w}$  en las nuevas condiciones de medición (diferentes a las del Capítulo B.3). Se presentan los resultados obtenidos para ambos tamaños de microelectrodo, y se demuestra que los de mayor tamaño poseen una mayor capacidad discriminante. Finalmente, se propone la utilización de estos MEAs y los resultados obtenidos para la detección de células cancerosas en cultivos mixtos.

### C.2.2. Introducción

En el Capítulo B.3 se analizó el comportamiento eléctrico de líneas celulares normales y cancerosas mediante una serie de mediciones de impedancia eléctrica realizadas con diferentes técnicas y separadas en 4 fases. A partir de estos experimentos, se determinaron las diferencias más importantes entre ambos tipos celulares y se propuso un método de discriminación basado en un análisis estadístico de ciertos parámetros característicos relevantes. La técnica propuesta en dicho estudio es válida únicamente para las condiciones de medición específicas del mismo, a saber:

- MEAs con un único electrodo ubicado en el centro de la superficie de cultivo.
- Microelectrodos de Au de  $250\ \mu\text{m}$  de diámetro.



- Cultivos independientes (separados) de células normales y cancerosas.

No obstante, siguiendo los objetivos específicos de esta tesis, en este capítulo se analiza la factibilidad de determinar la presencia de células cancerosas en cultivos mixtos, es decir, que contengan simultáneamente células normales y cancerosas. La primera dificultad que surge al diseñar un experimento que permita lograr dicho objetivo radica en el hecho de que se desconoce el comportamiento eléctrico de un cultivo de dichas características. En un cultivo formado por células idénticas, se sabe que luego de la inoculación éstas se depositan sobre el sustrato, se asientan y luego migran y se extienden sobre el mismo, formando enlaces entre ellas y dándole al cultivo una estructura de monocapa (en el caso de las células cancerosas, se cree que podrían formar también multicapas), lo cual se traduce en espectros de impedancia eléctrica que ya fueron analizados previamente. Ahora bien, en el caso más simple de un cultivo mixto, si se inocula en un mismo *well* una suspensión que contiene exactamente la misma cantidad de células vivas normales y cancerosas, es de esperar que se distribuyan de manera aleatoria cubriendo áreas aproximadamente iguales sobre la superficie de cultivo y, una vez asentadas, comiencen a migrar y extenderse. No obstante, en este caso se desconoce si las células adyacentes de diferente naturaleza se enlazarán entre sí y formarán una monocapa.

Aún si se formara una monocapa celular en un cultivo mixto, es de esperar que las características morfológicas y estructurales del mismo sean heterogéneas y, consecuentemente, también lo sean sus propiedades eléctricas. Esto implica que, si se pudiera disponer de un microelectrodo móvil, las mediciones de impedancia eléctrica arrojarían resultados diferentes al desplazarlo a través de la superficie del cultivo. Utilizar un único microelectrodo de área pequeña no proporcionaría entonces información suficiente para registrar dichas propiedades. En efecto, el área de cultivo en un *well* comercial típico (Sección B.1.1.1) es de  $32 \text{ mm}^2$ , mientras que el área del único microelectrodo presente en el mismo es de  $0,05 \text{ mm}^2$ , lo que representa un 0,16 % del total. No obstante, si bien el área total de medición es importante para poder detectar la presencia de células cancerosas, lo es aún más la distribución espacial de las mediciones a lo largo de toda el área de cultivo.

Para poder determinar la presencia de células cancerosas en un cultivo heterogéneo como el descrito anteriormente, se hace necesario entonces obtener información del mismo en diferentes partes la superficie cultivada. Para ello, en este capítulo se implementa un sistema que permite realizar mediciones de impedancia eléctrica en diferentes regiones espaciales de un mismo cultivo celular, utilizando los arreglos de microelectrodos con resolución espacial desarrollados en la Sección C.1.4.5.3, logrando registrar información en áreas hasta 6 veces mayores en 20 partes diferentes del cultivo. Además, se estudian dos tamaños diferentes de microelectrodos (50 y  $200 \mu\text{m}$ ) con el objeto de determinar las condiciones óptimas del experimento de discriminación.

## C.2.3. Materiales y métodos

### C.2.3.1. Cultivos celulares

En todos los experimentos de este capítulo se emplearon las mismas células utilizadas en el Capítulo B.3, es decir, las líneas NMuMG (normales) y LM3 (cancerosas). Para la realización de cultivos mixtos, se aplicó el mismo protocolo de siembra (Apéndice I) a dos suspensiones celulares en paralelo (una de células NMuMG y otra de células LM3), combinando finalmente ambas para formar una única suspensión que contenía aproximadamente 50 % de células normales y 50 % de células cancerosas con una densidad final aproximada de  $1 \times 10^6$  células·ml<sup>-1</sup>.

### C.2.3.2. MEAs

Como se mencionó en la Sección C.2.2, para poder determinar la presencia de células cancerosas en un cultivo mixto resulta necesario disponer de un sistema de medición de impedancia eléctrica con resolución espacial. En los dispositivos comerciales existentes [70], cada *well* contiene tan sólo uno o dos microelectrodos independientes<sup>1</sup> ubicados aproximadamente en el centro del círculo que representa el área de cultivo, por lo que no permiten obtener mediciones de espectros de impedancia con resolución espacial. Esto motivó el desarrollo de arreglos de microelectrodos adecuados para tal fin.

El primer arreglo de microelectrodos con resolución espacial que se desarrolló en este trabajo se denominó W1E20 y fue descrito detalladamente en la sección C.1.4.5.3. En este capítulo, todas las mediciones se realizaron utilizando este tipo de dispositivos fabricados con Au (99.9 % pureza) depositado sobre una capa de AuCu (70/30 w/w) como se describió en la Sección C.1.4.3. A su vez, para estudiar el efecto del tamaño de los microelectrodos en la capacidad de discriminación, se utilizaron microelectrodos de 50 y 200  $\mu$ m de diámetro<sup>2</sup>.

### C.2.3.3. Protocolo de medición

Como se explicó anteriormente, en los experimentos de detección de células transformadas en cultivos mixtos se empleó un protocolo de medición análogo al desarrollado en la sección B.3.3.2. No obstante, se realizaron algunas modificaciones en el mismo, las cuales se describen a continuación:

---

<sup>1</sup>Existen arreglos comerciales de múltiples electrodos conectados *en paralelo*, es decir, que no son independientes. La señal de excitación afecta a todos los electrodos simultáneamente y la medición resultante contiene información mixta proveniente de diferentes regiones de la monocapa (el área efectiva analizada es la suma de las áreas de todos los microelectrodos involucrados). Estos arreglos no son efectivos para discriminar células normales de cancerosas, ya que la señal obtenida es una mezcla de ambas respuestas eléctricas y se pierde sensibilidad al aplicar el algoritmo de discriminación.

<sup>2</sup>En realidad, los tamaños de los microelectrodos utilizados se encontraban cerca de dichos valores. Los diámetros equivalentes reales fueron medidos en todos los MEAs utilizados según lo descrito en la Sección C.1.4.4.

1. Se redujo la duración de todas las fases de medición, con el objeto de poder realizar mediciones en todos los microelectrodos contenidos en cada MEA a lo largo de todo el proceso. La duración de la fase de crecimiento fue establecida en 15 horas, teniendo en cuenta que ese tiempo es suficiente para alcanzar el estado estacionario, como se describió en la Sección [B.3.4.1](#).
2. En la fase de confluencia, se midió la impedancia eléctrica a 6 frecuencias diferentes en lugar de 15. Esta reducción se efectuó con el objeto de aumentar la velocidad de medición y así lograr realizar un barrido completo de la superficie de cultivo (es decir, la medición de todos los microelectrodos contenidos en el MEA) en un tiempo menor. Las frecuencias fueron seleccionadas en la parte media del espectro, donde la sensibilidad de la técnica ECIS es mayor, y por lo tanto este cambio no implicó una pérdida importante de información.
3. En la fase de herida, se realizó únicamente la medición del primer ciclo descrito en la Sección [B.3.4.3](#) (que, como se explicó en dicha sección, contiene la mayor parte de la información relevante), y luego se utilizó una señal de 2 V<sub>RMS</sub> y 64 kHz durante 60 s para asegurar la muerte celular completa sobre cada microelectrodo antes de la fase de cicatrización [\[17\]](#).

Con este protocolo modificado, fue posible realizar una medición del proceso completo en aproximadamente 26 horas.

#### C.2.3.4. Tamaño de los microelectrodos

La idea detrás de estos experimentos es detectar células cancerosas presentes en alguna porción de un cultivo mixto. Para ello, diferentes microelectrodos ubicados a lo largo del área de cultivo permiten realizar mediciones de impedancia eléctrica y utilizar esos datos para clasificar las muestras ubicadas sobre su superficie. Los microelectrodos comerciales utilizados en el Capítulo [B.3](#) poseen un área de  $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . El diámetro de una célula que forma parte de una monocapa está en el orden de los  $15 \mu\text{m}$  [\[28\]](#)<sup>3</sup>, y por lo tanto ocupa un área aproximada de  $177 \mu\text{m}^2$ . Esto significa que la señal proveniente de un microelectrodo de este tipo contiene información de aproximadamente 282 células. Cuando se trabaja con una línea celular, las características de las células individuales son muy similares y se espera que las señales obtenidas con un microelectrodo de ese tamaño en diferentes porciones de un mismo cultivo sean muy similares. No obstante, en un cultivo mixto dichas propiedades no serán homogéneas y es de esperar que las señales obtenidas en microelectrodos grandes, en ciertas porciones del cultivo donde estén presentes ambos tipos de células, sean también mixtas.

---

<sup>3</sup>Este es un valor registrado para células MDCK. No obstante, da una idea aproximada del orden de magnitud.

Para poder clasificar correctamente una muestra como normal o cancerosa en base al análisis LDA, es necesario que su vector de características pertenezca a alguna de las dos poblaciones de células que constituyen el conjunto de entrenamiento del algoritmo. Un vector con información mixta podría ubicarse dentro de cualquiera de ambas poblaciones, lo que podría aumentar la probabilidad de una clasificación incorrecta<sup>4</sup>. Debido a esto, se decidió realizar experimentos con microelectrodos de un tamaño típico (200  $\mu\text{m}$ ) y con otros de un tamaño menor (50  $\mu\text{m}$ , más cercano al tamaño celular), para analizar el efecto de esta variable sobre los resultados de discriminación.

## C.2.4. Resultados experimentales

Para poder determinar la naturaleza de una muestra desconocida aplicando la técnica desarrollada en el Capítulo B.3, es necesario conocer el vector discriminante  $\mathbf{w}$ , las proyecciones de las medias poblacionales correspondientes a ambos tipos celulares sobre la dirección dada por dicho vector y la proyección de  $\mathbf{x}$  (vector de características de la muestra bajo estudio) sobre la misma dirección. La ubicación de este último punto con respecto a las proyecciones de las medias poblacionales permite clasificar la muestra desconocida como normal o cancerosa. En dicho capítulo se determinó el valor de  $\mathbf{w}$  utilizando el protocolo originalmente desarrollado y MEAs comerciales de Au de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro equivalente. En este capítulo, sin embargo, las nuevas condiciones de medición (tamaño y material de los microelectrodos, protocolo de medición) hicieron necesario realizar nuevamente dicho análisis.

### C.2.4.1. Cultivos individuales de células normales y cancerosas

Antes de poder evaluar la presencia de células cancerosas en un cultivo mixto, es necesario determinar los parámetros característicos de células normales y cancerosas en las condiciones experimentales propuestas. A continuación se presentan los resultados obtenidos con cultivos independientes de células NMuMG y LM3 para los dos tamaños diferentes de microelectrodo. Las Tablas C.2.1 y C.2.2 resumen dichos resultados a través de los valores medios y desvíos estándar de los parámetros característicos en cada fase de medición para los microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. En el Capítulo B.3 se describió cada uno de estos parámetros.

---

<sup>4</sup>Entiéndase como clasificación incorrecta en este caso a un falso negativo, es decir, al fallo en la detección de células cancerosas.

**Tabla C.2.1:** Parámetros característicos extraídos de las mediciones de impedancia eléctrica en células normales y cancerosas según el protocolo desarrollado, para microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las unidades son las mismas que en la Tabla B.3.1. G: fase de crecimiento. C: fase de confluencia. W: fase de herida. H: fase de cicatrización.

Fase	Parámetro	NMuMG		LM3	
		$\mathbf{x_m}$	$\sigma$	$\mathbf{x_m}$	$\sigma$
G	$t_p$	3.4	2.7	8.8	1.8
	$R_p$	0.88	0.34	0.39	0.50
	$t_G$	9.8	0.68	3.8	0.91
	$s_C$	$3.7 \times 10^{-2}$	$5.4 \times 10^{-2}$	$9.5 \times 10^{-2}$	$3.8 \times 10^{-2}$
C	$R_n$	3.1	0.57	4.9	1.0
	$L_f$	6.9	0.11	8.0	0.36
	$C_n$	0.17	$4.4 \times 10^{-2}$	0.12	$3.7 \times 10^{-2}$
	$\sigma_R$	0.68	0.25	0.70	0.38
	$\sigma_C$	$5.6 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$
	$\alpha$	3.5	0.37	3.2	0.58
	$R_b$	1.1	0.37	2.7	0.72
	$C_m$	2.4	0.67	3.1	0.27
W	$a_R$	$-1.5 \times 10^{-2}$	$5.0 \times 10^{-3}$	$-8.9 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-3}$
	$b_R$	7.7	0.44	7.8	0.46
	$a_C$	$1.4 \times 10^{-2}$	$3.3 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^{-3}$	$3.2 \times 10^{-3}$
	$b_C$	-19.2	0.54	-19.6	0.35
	$a_1$	0.40	0.13	0.32	$8.4 \times 10^{-2}$
	$b_1$	$3.8 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-4}$	$7.5 \times 10^{-4}$	$2.7 \times 10^{-4}$
	$a_2$	0.71	0.17	0.65	0.17
	$b_2$	$5.9 \times 10^{-9}$	$2.6 \times 10^{-9}$	$4.2 \times 10^{-9}$	$1.6 \times 10^{-9}$
	$\delta_R$	-4.8	1.2	-0.33	0.11
	$\delta_C$	0.86	0.24	0.52	0.20
H	$t_R$	4.6	1.5	4.9	0.91
	$m_R$	$5.5 \times 10^{-2}$	0.27	0.2	$8.0 \times 10^{-2}$
	$t_C$	4.6	1.6	4.9	0.9
	$m_C$	$7.8 \times 10^{-2}$	0.12	0.34	0.17

**Tabla C.2.2:** Parámetros característicos extraídos de las mediciones de impedancia eléctrica en células normales y cancerosas según el protocolo desarrollado, para microelectrodos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las unidades son las mismas que en la Tabla B.3.1. G: fase de crecimiento. C: fase de confluencia. W: fase de herida. H: fase de cicatrización.

Fase	Parámetro	NMuMG		LM3	
		$\mathbf{x_m}$	$\sigma$	$\mathbf{x_m}$	$\sigma$
G	$t_p$	2.3	0.81	5.0	2.1
	$R_p$	1.0	0.0	0.89	0.32
	$t_G$	5.3	4.5	3.5	1.4
	$s_C$	$7.6 \times 10^{-2}$	$7.0 \times 10^{-2}$	$5.4 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-2}$
C	$R_n$	3.7	1.0	4.3	1.4
	$L_f$	7.9	0.23	8.0	0.29
	$C_n$	0.35	$9.1 \times 10^{-2}$	0.24	$6.1 \times 10^{-2}$
	$\sigma_R$	0.37	0.29	0.23	0.12
	$\sigma_C$	$2.7 \times 10^{-2}$	$2.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-2}$	$9.1 \times 10^{-3}$
	$\alpha$	1.5	1.4	0.77	0.19
	$R_b$	0.78	0.64	1.4	0.70
	$C_m$	44.7	13.4	30.6	5.2
W	$a_R$	$-1.3 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-4}$	$-1.5 \times 10^{-3}$	$8.6 \times 10^{-4}$
	$b_R$	9.0	0.21	9.1	0.14
	$a_C$	$3.4 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-3}$	$8.9 \times 10^{-4}$
	$b_C$	-21.6	0.34	-21.5	0.27
	$a_1$	0.56	0.30	0.70	0.29
	$b_1$	$2.7 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-4}$
	$a_2$	0.98	0.32	0.97	0.20
	$b_2$	$3.8 \times 10^{-10}$	$3.2 \times 10^{-10}$	$2.6 \times 10^{-10}$	$1.7 \times 10^{-10}$
	$\delta_R$	-0.17	0.12	-0.16	0.16
	$\delta_C$	0.85	0.28	0.79	0.22
H	$t_R$	2.0	0.67	2.4	1.0
	$m_R$	0.58	0.28	0.77	0.34
	$t_C$	2.1	0.74	2.6	1.0
	$m_C$	0.20	0.12	0.10	$6.3 \times 10^{-2}$

Los electrodos pequeños de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro (aproximadamente 1964  $\mu\text{m}^2$  de área), poseen la ventaja de estar cubiertos por una pequeña cantidad de células (entre 10 y 20), lo cual reduciría la probabilidad de obtener señales mixtas en un cultivo de células normales y cancerosas. No obstante, presentan complicaciones que fueron analizadas en un trabajo anterior [26]. Por un lado, la impedancia de estos microelectrodos es mayor a la de los que

poseen mayor tamaño, como se mostró y explicó en la Sección C.1.5.1. Esto hace que la sensibilidad de los mismos ante la presencia de células sea menor, ya que la impedancia de éstas es la misma independientemente del tamaño del microelectrodo<sup>5</sup>, y esto se vio reflejado en los valores de resistencia y capacidad normalizadas. Por otro lado, los parámetros del modelo de Giaever y Keese en microelectrodos de este tamaño presentaron valores muy apartados de los correspondientes a microelectrodos de tamaño mayor. Esto se observó previamente en el trabajo de Bast [26] y se adjudicó al hecho de que dicho modelo no considera la existencia de corrientes que fluyen radialmente hacia fuera del microelectrodo (efecto que aumenta significativamente a medida que se reduce el tamaño del mismo). Los parámetros determinados con este modelo para microelectrodos pequeños resultan entonces incompatibles con los valores calculado mediante otros métodos, y pierden por lo tanto relevancia desde un punto de vista biológico. No obstante, dichos parámetros característicos brindan aún información valiosa que permite realizar una discriminación entre células normales y cancerosas, por lo que no se los omitió en el análisis.

En los MEAs W1E20 con microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, los resultados resultan relativamente similares a los obtenidos en el Capítulo B.3 con MEAs comerciales de 250  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se observan también algunas diferencias, principalmente con respecto a los parámetros del modelo de Giaever y Keese.

#### C.2.4.1.1. Análisis y selección de parámetros característicos

En esta sección se presentan los resultados del procesamiento de las mediciones realizadas para ambos tamaños de microelectrodo. El análisis que sigue es idéntico al realizado en la Sección B.3.5. A continuación se presenta una tabla con los resultados de los *tests* F, de Student y de Kolmogorov-Smirnov para las mediciones realizadas con microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Valores de probabilidad  $p < 1 \times 10^{-3}$  se consideraron como más significativos y el criterio para seleccionar los parámetros característicos del análisis LDA fue el mismo que se empleó en la Sección B.3.5.1.

---

<sup>5</sup>En realidad, esto depende de la forma en que las células se adhieren a la superficie del microelectrodo. Como en este caso las células están siempre adheridas a la superficie de un mismo material (Au), es de esperar que se comporten de la misma manera. Esto hace razonable la suposición de que su impedancia será idéntica independientemente del tamaño del microelectrodo.

**Tabla C.2.3:** Resultados de los *tests* F, t y KS para MEAs W1E20 con microelectrodos de  $200\ \mu\text{m}$  y  $50\ \mu\text{m}$  de diámetro. Valores de probabilidad menores a  $1 \times 10^{-3}$  fueron tomados como más significativos y se simbolizan con el signo +. Los parámetros característicos marcados con el signo + en la columna +/- se consideran relevantes en el modelo de discriminación propuesto.

G: fase de crecimiento. C: fase de confluencia. W: fase de herida. H: fase de cicatrización.

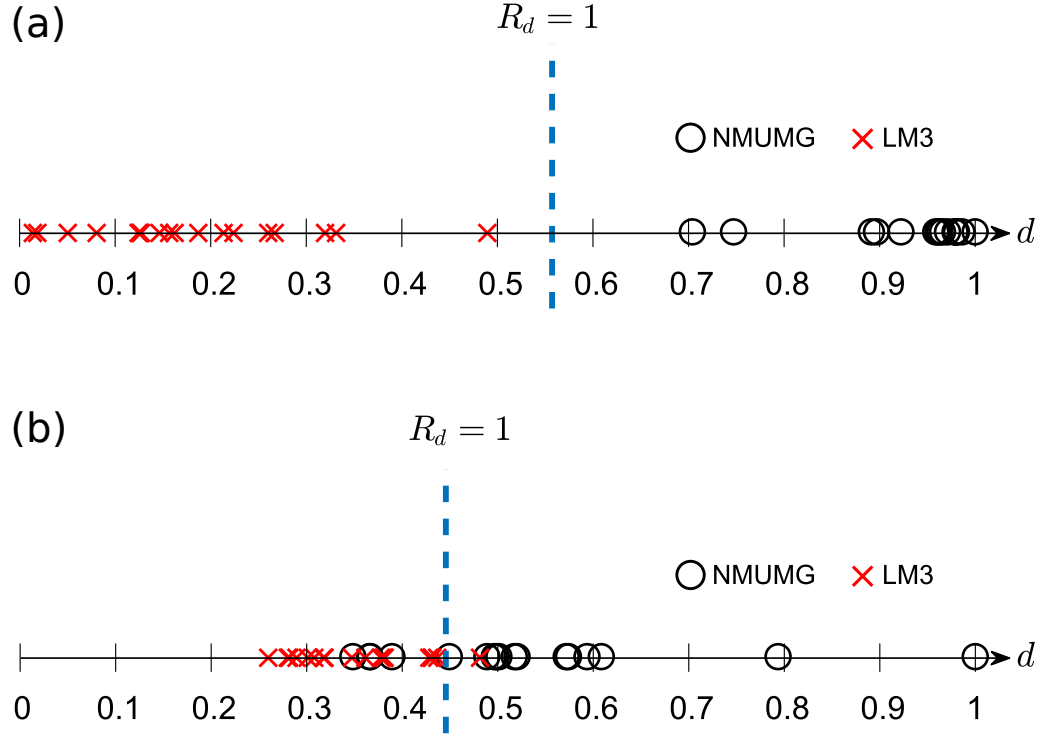
Fase	Parámetro	50 $\mu\text{m}$				200 $\mu\text{m}$			
		F	t	KS	+/-	F	t	KS	+/-
G	$t_p$	+	+	+	+	-	+	-	-
	$R_p$	-	-	+	-	-	+	+	+
	$t_G$	+	-	-	-	-	+	+	+
	$s_C$	+	+	+	+	-	+	-	-
C	$R_n$	-	-	-	-	-	+	+	+
	$C_n$	-	+	+	+	-	+	+	+
	$L_f$	-	-	-	-	+	+	+	+
	$\alpha$	+	+	+	+	-	-	-	-
	$R_b$	-	+	-	-	-	+	+	+
	$C_m$	+	+	+	+	+	-	-	-
	$\sigma_R$	+	-	-	-	-	-	-	-
	$\sigma_C$	+	-	+	+	-	+	+	+
W	$a_1$	-	-	-	-	-	-	-	-
	$b_1$	-	-	-	-	-	+	+	+
	$a_2$	-	-	-	-	-	-	-	-
	$b_2$	-	-	-	-	-	-	+	-
	$a_R$	-	-	-	-	-	+	+	+
	$b_R$	-	-	-	-	-	-	-	-
	$a_C$	-	-	-	-	-	+	+	+
	$b_C$	-	-	-	-	-	-	+	-
	$\delta_R$	-	-	-	-	-	+	-	-
	$\delta_C$	-	-	-	-	-	+	+	+
H	$t_R$	-	-	-	-	-	-	-	-
	$m_R$	-	-	-	-	+	+	+	+
	$t_C$	-	-	-	-	-	-	-	-
	$m_C$	+	+	+	+	+	+	+	+

#### C.2.4.1.2. Análisis de discriminante lineal (LDA)

A diferencia de los experimentos realizados en el Capítulo B.3, en este caso todos los vectores de características estaban completos y no fue necesario aplicar ningún método para tratar datos faltantes. Utilizando los parámetros característicos seleccionados en la Sección



C.2.4.1.1, se realizó el análisis de discriminante lineal sobre los resultados correspondientes a ambos tamaños de microelectrodo, y los resultados se muestran en la Figura C.2.1. A diferencia de la Figura B.3.7, en este caso las distancias euclídeas fueron normalizadas para que su rango de variación se encuentre entre los valores 0 y 1 con el objeto de facilitar la visualización de los resultados.



**Figura C.2.1:** Distancias euclídeas con respecto a la dirección dada por el vector discriminante  $\mathbf{w}$  para los dos tamaños de microelectrodo analizados. La Figura (a) corresponde a microelectrodos de  $200 \mu\text{m}$  y la Figura (b) a microelectrodos de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro. Los datos experimentales se representan como círculos negros y cruces rojas para células normales y cancerosas, respectivamente. Las líneas cortadas azules en ambas figuras representan la frontera entre ambas poblaciones, donde  $R_d = 1$ .

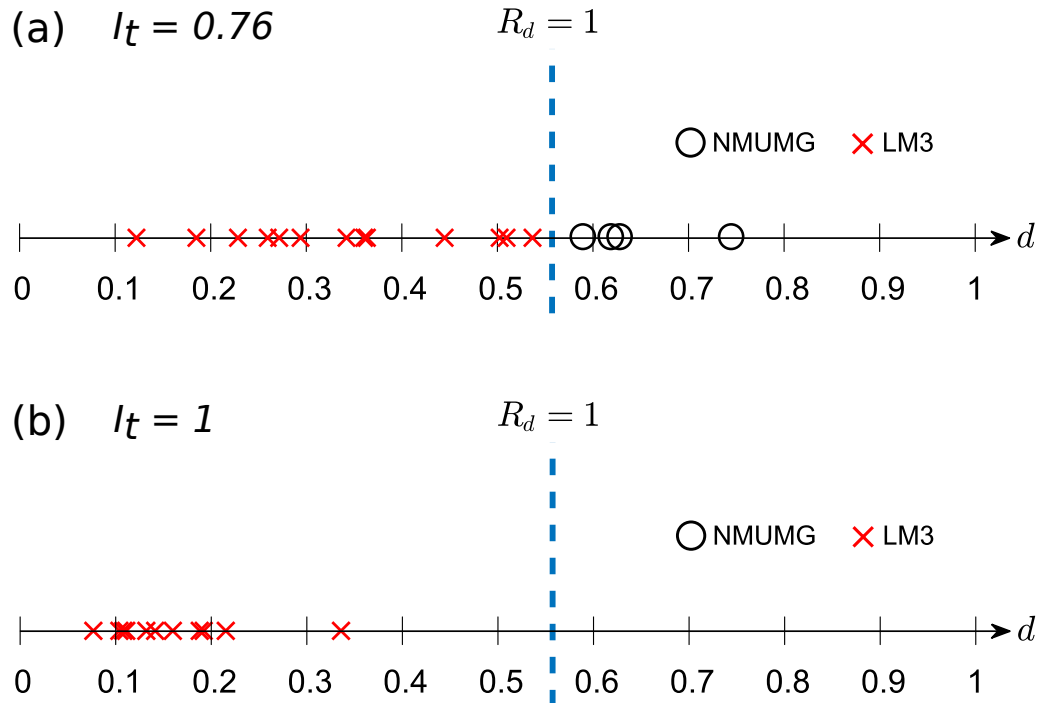
Como se observa en la Figura C.2.1, la separación entre las poblaciones de células normales y cancerosas fue mucho mayor en los microelectrodos de  $200 \mu\text{m}$  de diámetro, en los cuales el análisis LDA no arrojó ninguna clasificación incorrecta. En cambio, en los microelectrodos de  $50 \mu\text{m}$  se obtuvo 23,5% de falsos positivos y 5,6% de falsos negativos. Este resultado llevó a considerar únicamente microelectrodos de  $200 \mu\text{m}$  de diámetro para el estudio de cultivos mixtos que se presenta en la sección siguiente.

## C.2.4.2. Cultivos mixtos de células normales y cancerosas

En esta última sección se presentan los primeros resultados de mediciones realizadas sobre cultivos mixtos consistentes en aproximadamente 50% de células normales y 50% de células cancerosas empleando microelectrodos de  $200 \mu\text{m}$  de diámetro. Cabe aclarar que los resultados aquí expuestos no son concluyentes, y es necesario realizar una serie de ajustes a la

técnica de cultivo para poder repetir los experimentos en condiciones que permitan obtener resultados más representativos y de esta manera extender las conclusiones. Se llevaron a cabo múltiples pruebas realizando diversas modificaciones, y en todas ellas se puso de manifiesto una dificultad experimental: sólo se detectó crecimiento celular a través de las mediciones de impedancia eléctrica en algunos de los microelectrodos presentes en el MEA (que tiene en total 20 microelectrodos), mientras que en los demás no se detectaron cambios con respecto a los microelectrodos desnudos. Esto sugiere que las células no se adhirieron y/o no sobrevivieron en esas regiones del cultivo, lo que representa un problema a la hora de interpretar los datos. Debido a esto, sólo serán expuestos aquí los resultados de dos experimentos de cultivos mixtos realizados en condiciones idénticas.

En cada experimento, se realizó el cultivo como se indica en la Sección C.2.3.1 y luego se procedió con las mediciones tal como se indica en la Sección C.2.3.3. A partir de los resultados de dichas mediciones, se determinaron los vectores de características  $\mathbf{x}_i$  correspondientes a cada una de las muestras provenientes del mismo cultivo mixto (ubicadas sobre la superficie de los diferentes microelectrodos en el mismo MEA). Con estos vectores y los resultados del análisis LDA de la Sección C.2.4.1.2, se aplicó el algoritmo de clasificación para determinar la naturaleza de cada una de las muestras, y los resultados se muestran en la Figura C.2.2 para dos experimentos diferentes.



**Figura C.2.2:** Clasificación de las diferentes muestras provenientes de un mismo cultivo mixto a partir del algoritmo de discriminación. Las figuras (a) y (b) representan dos cultivos diferentes. En el primero (a), sólo 17 de los 20 microelectrodos mostraron respuestas eléctricas características de cultivos celulares, mientras que en el segundo (b) este número se redujo a 11 microelectrodos. En cada caso, se indica el índice de transformación  $I_t$  del cultivo.

El objetivo general de este estudio incluye la obtención de un indicador biológico que pueda ser considerado en el diagnóstico de cáncer. Para ello, es necesario que dicho indicador sea fácil de comprender y de medir. A partir de los resultados del algoritmo de clasificación, se definió el *índice de transformación*  $I_t = N_c/N_T$ , donde  $N_c$  y  $N_T$  representan el número de muestras clasificadas como cancerosas y el número total de muestras, respectivamente. De esta manera, valores de  $I_t$  mayores a cero indicarían la presencia de células transformadas en algunas regiones del cultivo, y cuanto más cercano sea este valor a la unidad, tanto mayor será la proporción de células transformadas detectadas. En la Figura C.2.2 se muestran los resultados correspondientes a dos cultivos mixtos diferentes. En el primero de ellos (figura C.2.2(a)), 13 muestras fueron clasificadas como cancerosas y 4 como normales, dando como resultado un índice de transformación igual a 0,76. En dicho experimento, 3 de los microelectrodos no mostraron variaciones de sus valores de impedancia eléctrica con respecto a los microelectrodos desnudos, y por lo tanto no se incluyeron en el análisis. En la figura C.2.2(b) se muestran los resultados de otro experimento en el que sólo se detectó la presencia de células en 11 de los 20 microelectrodos. En este caso, todas las muestras fueron clasificadas como cancerosas, por lo que  $I_t = 1$ . Como puede observarse, los resultados son muy diferentes teniendo en cuenta que los experimentos fueron realizados de forma idéntica, y debido a esto no resultan concluyentes. Además, en los otros experimentos realizados con cultivos mixtos (no mostrados en la figura) se detectó la presencia de células en menos de 7 microelectrodos, por lo cual no fueron considerados como representativos y se omitió su análisis.

## C.2.5. Conclusiones

Se implementaron MEAs con resolución espacial desarrollados en este trabajo para determinar parámetros característicos de células normales y cancerosas mediante el protocolo de medición desarrollado en el Capítulo B.3. Se estudiaron dos tamaños diferentes de microelectrodos, a saber, 200  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , y el material de los mismos fue Au depositado sobre una capa de AuCu.

Se demostró que es posible discriminar ambos tipos celulares utilizando los MEAs desarrollados con ambos tamaños de microelectrodo. Los microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$  arrojaron resultados relativamente similares a los obtenidos con microelectrodos comerciales de 250  $\mu\text{m}$  (Capítulo B.3), mientras que los microelectrodos de 50  $\mu\text{m}$  mostraron diferencias importantes en cuanto a los valores de los parámetros determinados. Además, el análisis LDA demostró que los microelectrodos de mayor tamaño poseen una capacidad discriminante mucho mayor: se obtuvo un 23,5 % de falsos positivos y 5,6 % de falsos negativos con microelectrodos de 50  $\mu\text{m}$  y ninguna clasificación incorrecta con microelectrodos de 200  $\mu\text{m}$ .

Se realizaron experimentos con cultivos mixtos de células NMuMG y LM3, y se utilizó el algoritmo de clasificación para determinar la presencia de células transformadas en

los mismos. Además, se definió el índice de transformación  $I_t$ , que resume toda la información obtenida a través de las mediciones de impedancia eléctrica y constituye un indicador que podría ser utilizado como soporte en el diagnóstico de cáncer. No obstante, los resultados experimentales obtenidos con cultivos mixtos fueron poco reproducibles y no resultaron concluyentes. Se atribuye la disparidad de estos resultados a dificultades experimentales asociadas a la biología de los cultivos mixtos, lo que se encuentra fuera del alcance de esta investigación.

Con los resultados obtenidos, se propone la realización de experimentos con cultivos mixtos utilizando diferentes proporciones de células normales y cancerosas a fines de determinar la presencia de estas últimas mediante el algoritmo de clasificación. Para ello, los MEAs utilizados resultan adecuados debido a que poseen resolución espacial y permiten estudiar simultáneamente diferentes porciones de la monocapa celular, incrementando la probabilidad de detectar células cancerosas en el cultivo. No obstante, es necesario en primer lugar perfeccionar las técnicas biológicas de cultivos mixtos para poder obtener resultados reproducibles.

## Parte D

### Conclusiones y trabajos futuros

A lo largo de este trabajo, se utilizó la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica celular (ECIS) para estudiar el comportamiento de cultivos celulares normales y cancerosos. En primer lugar, se realizaron pruebas con células de referencia (MDCK) para poner a punto las técnicas de medición y se realizaron mejoras significativas sobre el sistema existente mediante la incorporación de un nuevo instrumento de medición y de un circuito selector de canales que permite realizar múltiples mediciones de manera automatizada.

Se diseñó e implementó un ensayo de herida y cicatrización a partir de la técnica ECIS que permite obtener información acerca de la dinámica de la muerte celular. Para ello, se utilizó un sistema de medición alternativo basado en un medidor LCR configurado para mediciones a alta velocidad. Los resultados de este ensayo permitieron extraer parámetros característicos que fueron utilizados posteriormente para discriminar células normales de cancerosas.

Se estudió la respuesta eléctrica de células normales (NMuMG) y cancerosas (LM3) bajo diferentes condiciones de medición, y se encontraron diferencias importantes que permitieron discriminarlas. Se elaboró un protocolo de medición que incluye 4 fases diferentes: crecimiento, confluencia, herida y cicatrización. En cada una de estas fases se determinó un conjunto de parámetros característicos, de los cuales se seleccionaron los más relevantes a partir de un análisis estadístico de su capacidad de discriminación, reduciendo así la dimensión del problema. A partir de los datos seleccionados, se realizó un análisis de discriminante lineal (LDA) para encontrar la dirección de máxima discriminación. Los resultados muestran que es posible lograr una discriminación con valores de falsos positivos y falsos negativos menores a 5 %, y se espera mejorar aún más los resultados incorporando al análisis la fase de *micromotion* e incrementando el número de muestras utilizadas en la derivación del vector de discriminación.

Se diseñaron y fabricaron diferentes tipos de arreglos de microelectrodos (MEAs) biocompatibles para su aplicación en ensayos de discriminación entre células normales y cancerosas en cultivos individuales y mixtos. Se utilizó por primera vez AuCu como material para los electrodos, y se evaluó su funcionamiento con cultivos de células de referencia (MDCK). Los resultados mostraron que los electrodos de AuCu tienen una mayor sensibilidad que los de Au (material comercial estándar) en mediciones con la técnica ECIS, si bien presentan una menor biocompatibilidad. Se estableció además un protocolo de microfabricación que puede ser utilizado en el futuro como base para el desarrollo de nuevos MEAs.

Como primera parte de un experimento de discriminación en cultivos mixtos, se utilizaron MEAs con resolución espacial desarrollados en este trabajo para determinar las fronteras de discriminación mediante el análisis LDA. Se emplearon microelectrodos de 50 y 200  $\mu\text{m}$ , y se demostró que ambos tipos de MEAs permiten discriminar células normales de cancerosas. El análisis LDA reveló que los microelectrodos de mayor tamaño poseen una capacidad discriminante mucho mayor, obteniéndose un 23,5 % de falsos positivos y 5,6 % de falsos negativos con microelectrodos de 50  $\mu\text{m}$  y ninguna clasificación incorrecta con microelectrodos

---

de 200  $\mu\text{m}$ . Es importante aclarar que, en el marco del diagnóstico clínico, los falsos positivos constituyen un riesgo menor para un paciente que los falsos negativos.

Se realizaron experimentos de detección de células LM3 en cultivos mixtos que contenían también células NMuMG en proporciones aproximadamente iguales. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron poco reproducibles y no resultaron concluyentes. Las discrepancias encontradas entre los experimentos se atribuyen principalmente a la biología de los cultivos mixtos, la cual no ha sido aún explorada en profundidad y constituye un problema que excede el alcance de esta tesis. A pesar de esto, se analizaron los resultados y se definió un indicador que se denominó índice de transformación  $I_t$ , el cual engloba la información obtenida a través de las mediciones de impedancia eléctrica y podría ser utilizado como soporte en el diagnóstico de cáncer (con datos obtenidos de mediciones representativas).

Con los resultados obtenidos en la última fase de este trabajo y los MEAs desarrollados, se propone como trabajo futuro efectuar experimentos con mezclas controladas de células normales y cancerosas (en diferentes proporciones) y determinar en cada caso el índice de transformación. Para lograr esto, es indispensable en primer lugar realizar un estudio profundo de las técnicas de cultivos celulares mixtos, ya que el éxito del método de discriminación desarrollado en este trabajo depende en gran medida del correcto desarrollo de las capas celulares sobre los microelectrodos. Finalmente, como trabajo posterior a los experimentos con cultivos mixtos de líneas celulares se propone realizar una investigación que involucre la detección de células cancerosas en cultivos primarios, obtenidos a partir de piezas quirúrgicas extraídas de tumores de pacientes humanos.

# Apéndice I

## Protocolos de siembra y preservación de células

### Siembra

#### Materiales y equipos:

1. *Flask* que contenga las células a cultivar.
2. Medio de cultivo estéril (Sección [B.1.3.1](#)).
3. Solución de tripsina (0,05 % p/v tripsina — 0,53 mM EDTA·4Na).
4. Solución de etanol en agua 70/30 v/v.
5. Agua deionizada estéril.
6. Campana de flujo laminar.
7. Mechero a gas.
8. Estufa de cultivos (incubadora).
9. Pipetas de 5 ml estériles.
10. Pipetas Pasteur estériles.
11. Microscopio óptico invertido.
12. Centrífuga.
13. Cronómetro.

#### Protocolo:



1. Retirar el medio de cultivo que se encuentra en la heladera (a 4 °C) y llevarlo a 25 °C utilizando baño María.
2. Limpiar la superficie de trabajo de la campana de flujo laminar con la solución de etanol. Luego, encender el mechero y colocarlo en el interior de la misma. Esperar 10 minutos antes de continuar.
3. Limpiarse profundamente las manos, primero con agua y jabón y luego con la solución de etanol para reducir la carga microbiana.
4. Retirar de la incubadora el *flask* que contiene las células y depositarlo en el interior de la campana de flujo laminar, a menos de 20 cm de distancia de la llama del mechero.
5. Descartar el líquido contenido en el *flask* y, utilizando una pipeta estéril, colocar 2 ml de la solución de tripsina a 25 °C dentro del mismo.
6. Dejar reposar el sistema durante aproximadamente 2 min en la campana, a temperatura ambiente. Se observará un ligero cambio en el *flask*, como una “sombra”. A temperatura ambiente, el efecto de la enzima tripsina es bajo y las células vivas siguen adheridas al *flask*.
7. Descartar el líquido que se encuentra en el *flask* y agregar 2 ml de solución fresca de tripsina, empleando una pipeta estéril. Colocar en la incubadora a 37 °C (a esta temperatura el efecto de la enzima es óptimo).
8. Dejar reposar el sistema durante aproximadamente 15 minutos, luego retirarlo y observar en el microscopio con un aumento de 40x. Si las células se despegaron del *flask*, entonces se verán redondeadas y en un plano de observación superior al inicial<sup>1</sup>. En caso de que no se hayan despegado, volver a colocar el sistema en la estufa a 37 °C y esperar unos pocos minutos (menos de 5). Luego, retirar y volver a realizar la observación.
9. Una vez finalizado el tratamiento con tripsina, inhibir su acción mediante el agregado de medio de cultivo fresco ( $\sim 4$  ml) en el *flask*, empleando una pipeta estéril. Realizar esta operación sin descartar la solución de tripsina, ya que ésta contiene las células en suspensión.
10. Trasvasar el contenido del *flask* (compuesto por células, tripsina y medio de cultivo) a tubos de centrífuga utilizando una pipeta estéril. Realizar una centrifugación con  $\omega \approx 850$  rpm durante aproximadamente 10 min. Observar la separación de fases (se forma un *pellet* blanco en el fondo de los tubos, que consiste en el agregado de células). Descartar el líquido sobrenadante (vertiéndolo enérgicamente en un recipiente) y volver a centrifugar durante aproximadamente 2 min a la misma velocidad.

---

<sup>1</sup>No se deben confundir las células vivas despegadas con las células muertas, que son redondeadas y refringentes, y están siempre en un plano de observación superior a las vivas.

11. Resuspender el *pellet* mediante el agregado de 4 ml de medio de cultivo fresco con una pipeta de tipo Pasteur estéril, y realizar la inoculación en los *wells* y *flasks* necesarios.

## Preservación

A lo largo de esta investigación, se emplearon dos métodos diferentes para preservar correctamente los cultivos celulares. El primero consiste en enfriar las células de forma gradual utilizando rampas de temperatura, siguiendo un protocolo desarrollado por el grupo de trabajo en su experiencia previa a la realización de esta tesis, como se describe en la Tabla I.1:

**Tabla I.1:** Protocolo de congelamiento de células.  $T_{\text{amb}}$ : temperatura ambiente.  $T_c$ : temperatura de las células.

Intervalo de temperaturas	Velocidad de enfriamiento
$T_{\text{amb}} > T_c > -25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$
$-25\text{ }^{\circ}\text{C} > T_c > -40\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$
$-40\text{ }^{\circ}\text{C} > T_c > -70\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Para poder llevar a cabo el proceso de congelamiento con estas rampas de temperatura, se utilizó un dispositivo que consiste en un termo de vidrio lleno con nitrógeno líquido, en cuyo fondo se coloca un resistor conectado a una fuente de corriente continua (ubicada fuera del termo). Los criotubos con células se colocan en un soporte ubicado en la parte más alta del termo, a una distancia de aproximadamente 20 cm con respecto a la superficie del líquido. Uno de estos criotubos se mantiene sólo con medio de cultivo (sin células) y en él se coloca el extremo de una termocupla conectada a un lector de termocuplas. Se controla la temperatura del sistema minuto a minuto y se registran los valores en una tabla. Si la velocidad de enfriamiento es demasiado alta, se aleja el soporte que contiene los criotubos para reducir el contacto con el vapor de  $\text{N}_2$ . En cambio, para incrementar la velocidad de enfriamiento se hace pasar una corriente a través del resistor, el cual disipa la potencia en forma de calor. Este calor induce la formación de un núcleo de evaporación en el fondo del termo, haciendo que se genere un caudal de vapor de  $\text{N}_2$  a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el cual entra en contacto con la superficie de los criotubos. Dicho caudal puede ser regulado con la corriente aplicada, la cual se ajusta directamente desde la fuente. Este método, si bien es artesanal y laborioso, resultó de mucha practicidad para conservar las células.

Durante el transcurso de este trabajo, se adquirió una heladera que posee un congelador cuya temperatura puede ser ajustada hasta  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir de entonces, se utilizó un método de congelamiento diferente, el cual fue sugerido por un profesional externo (J. Tau, comunicación personal, 3 de septiembre de 2016). En primer lugar, se recubren los criotubos

con una capa gruesa de algodón y se los coloca en un recipiente de poliestireno expandido de 1 cm de espesor. Dicho recipiente se coloca luego en la heladera a 4 °C durante 2 horas y finalmente se deposita en el congelador a -20 °C durante un mínimo de 8 horas. Transcurrido este tiempo, se colocan los tubos en el termo de conservación.

## Apéndice II

# Ajuste de datos al modelo de Giaever y Keese

En los Capítulos B.3 y C.2 se realizó la estimación de los parámetros del modelo de Giaever y Keese (Sección A.2.3) como parte del análisis de la fase de confluencia en experimentos de discriminación entre células normales y cancerosas. Para realizar dicha estimación, se partió de los resultados experimentales de  $Z_{cov}$  y  $Z_{nak}$  y de la medición del área del microelectrodo. Luego, se implementó un algoritmo de optimización para minimizar la función conocida como *Chi cuadrado* [59]:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^{N-1} \frac{[Z_i - Z(f_i|\alpha, R_b, C_m)]^2}{\sigma_i^2}, \quad (\text{II.1})$$

donde  $Z_i$  es el valor experimental de la impedancia compleja específica (dividida por el área) del microelectrodo cubierto con células, medido a la  $i$ -ésima frecuencia,  $Z(f_i|\alpha, R_b, C_m)$  es la impedancia compleja específica a la misma frecuencia calculada a partir de las ecuaciones (A.2.3), y  $\sigma_i^2$  es el error asociado a la medición.

Se presenta ahora un análisis del error involucrado en las mediciones de impedancia utilizando el esquema de medición estándar de la Sección B.1.1.2. Las magnitudes obtenidas en cada medición son la amplitud  $R$  y la fase  $\theta$  de la señal de entrada con respecto a la referencia, tanto para el voltaje total  $V_t$  como para el voltaje a través del electrodo  $V_e$  (ver Ecuación (B.1.1) y Figura B.1.5). En la ecuación (A.2.3) aparecen las impedancias complejas del electrodo desnudo y del electrodo cubierto con células. Dichas magnitudes pueden representarse mediante su módulo  $|Z|$  y su fase  $\phi$ :

$$Z = |Z| e^{j\phi}. \quad (\text{II.2})$$

Para cada frecuencia de excitación, tanto el módulo como la fase de la impedancia de-

penden de las amplitudes y fases de los voltajes medidos, es decir:

$$|Z| = g_1(V_t, \theta_t, V_e, \theta_e), \quad (\text{II.3a})$$

$$\phi = g_2(V_t, \theta_t, V_e, \theta_e). \quad (\text{II.3b})$$

Para encontrar la expresión analítica del error  $\sigma_i^2$ , debe realizarse en primer lugar una propagación de errores. Esto viene dado por la fórmula de la varianza:

$$\sigma_i^2 = \sum_{j=1}^4 \left( \frac{\partial Z}{\partial x_j} \right)^2 \sigma_{x_j}^2, \quad (\text{II.4})$$

donde las  $x_j$  representan las cuatro variables  $V_t$ ,  $\theta_t$ ,  $V_e$  y  $\theta_e$ , medidas a la frecuencia  $f_i$ . Debido a la complejidad matemática de las expresiones analíticas de las derivadas parciales que aparecen en la Ecuación (II.4), se realizó su cálculo de forma numérica. Los errores  $\sigma_{x_j}$  que aparecen en la misma ecuación fueron obtenidos del manual del instrumento [71], y sus valores son:

$$\begin{aligned} \sigma_V &= 0,02 V, \\ \sigma_\theta &= \frac{\pi}{180} rad. \end{aligned}$$

A partir este análisis, se determinaron los valores de  $\sigma_i^2$  que aparecen en el denominador de la Ecuación (II.1). Dichos errores resultaron significativamente mayores a frecuencias bajas (menores a 300 Hz), y por lo tanto su contribución en el proceso de minimización de la función Chi cuadrado fue muy baja. Esta fue la razón por la cual se decidió omitir dichas frecuencias en las mediciones del Capítulo C.2.

## Apéndice III

# Determinación del estado estacionario en curvas de siembra, herida y cicatrización

A lo largo de esta tesis, se presentaron experimentos que involucraron cambios de impedancia hasta alcanzar un estado estacionario. Específicamente, estos experimentos corresponden a las fases de crecimiento, herida y cicatrización. En todos estos casos, los datos obtenidos presentaron un comportamiento similar al de la Figura III.1, donde se muestran la resistencia y la capacidad equivalentes durante el crecimiento de una monocapa de células MDCK (ver Figura B.2.2). Para determinar cuantitativamente el inicio del estado estacionario, se recurrió al siguiente procedimiento:

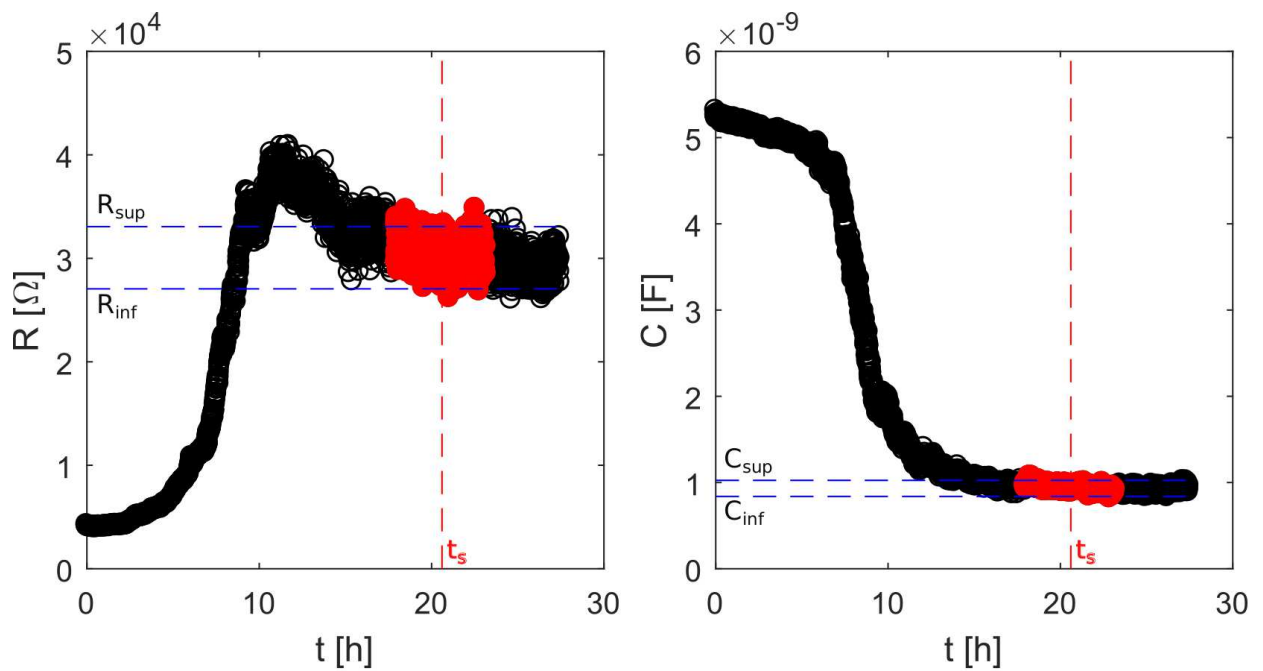
1. Se calculó el valor medio de resistencia ( $\bar{R}$ ) y capacidad ( $\bar{C}$ ) en el estado estacionario, promediando los valores medidos durante las últimas dos horas<sup>1</sup>.
2. Se determinaron los límites superiores ( $R_{sup}$  y  $C_{sup}$ ) e inferiores ( $R_{inf}$  y  $C_{inf}$ ) en el estado estacionario, teniendo en cuenta las fluctuaciones típicas de estas señales. En general, dichas fluctuaciones dependen del tamaño del microelectrodo (son mayores para microelectrodos más pequeños) y de la frecuencia de la señal de excitación, y tienen una amplitud de entre 2 % y 15 % del valor medio en el estado estacionario. Se decidió entonces adoptar una amplitud de 10 % para ubicar los límites superiores e inferiores en ambas señales (líneas cortadas azules en la Figura III.1).
3. Se utilizó una ventana temporal ( $t_i, t_f$ ) de amplitud fija y se determinó el porcentaje de valores de  $R$  y  $C$ , dentro de dicha ventana, que se encuentran dentro de los límites superiores e inferiores en el estado estacionario. La amplitud de la ventana fue de 6 horas para señales de duración mayor a 24 horas (por ejemplo, curvas de crecimiento

---

<sup>1</sup>En todos los casos, las mediciones se realizaron hasta alcanzar definitivamente el estado estacionario, lo que se observó de manera cualitativa a partir de las curvas obtenidas.

como la de la Figura III), de 3 horas para señales de duración entre 18 y 24 horas (por ejemplo, las curvas de crecimiento del Capítulo B.3) y de 2 horas para señales de duración entre 8 y 18 horas (por ejemplo, las curvas de cicatrización del capítulo B.3).

4. Finalmente, se determinó tiempo  $t_s$ , correspondiente al inicio del régimen estacionario, como el punto medio del primer intervalo en el cual el 95 % de los valores de  $R$  y  $C$  se encuentran dentro de los límites adoptados.



**Figura III.1:** Determinación del inicio del régimen estacionario en la fase de crecimiento de un cultivo de células MDCK. Las líneas cortadas horizontales azules representan los límites superiores e inferiores de fluctuación durante el estado estacionario, y fueron determinadas utilizando una amplitud de 10 % alrededor del valor medio. Los puntos marcados con color rojo representan la primera ventana temporal (de 6 horas de amplitud) en la que el 95 % de los datos se encuentran dentro de los límites adoptados (tanto para la resistencia como para la capacidad).

El tiempo de inicio del régimen estacionario,  $t_s$ , es el punto medio de dicho intervalo.

## Apéndice IV

# Protocolo de fabricación de MEAs en el Centro Atómico Bariloche

### Etapas de la microfabricación

1. Obtención del sustrato.
2. Primera limpieza del sustrato.
3. *Sputtering*.
4. Segunda limpieza (igual al paso 2).
5. Primera fotolitografía: patrón de pistas y pads.
6. Formación del patrón metálico mediante *Reactive Ion Etching*.
7. Tercera limpieza (igual al paso 2).
8. Segunda fotolitografía: aislación.
9. Cuarta limpieza (únicamente *Plasma O<sub>2</sub>*).

### Obtención y limpieza previa del sustrato

**Lugar de trabajo:** Sala limpia (sala amarilla).

**Materiales y equipos:**

1. Portaobjetos de vidrio convencionales (75mm x 25mm x 1mm).
2. Acetona de calidad analítica.



3. Alcohol isopropílico de calidad analítica.
4. Agua deionizada.
5. Equipo de limpieza con ultrasonido.
6. Plancha calefactora de temperatura regulable.
7. Cronómetro.
8. Vaso de precipitados x3.
9. Pinzas para transportar el sustrato.
10. Equipo de tratamiento con plasma de O<sub>2</sub>: *Plasma-Preen I Plasma Cleaner*.

## **Protocolo:**

### **Obtención del sustrato**

1. Cortar los portaobjetos de vidrio en cuadrados de 25 mm de lado, utilizando una lapicera con punta de diamante y otro portaobjetos como molde (colocarlo a 90° con respecto al que se va a cortar). Marcar una línea en el lugar que se desea cortar y luego quebrar el vidrio con las manos, ejerciendo una presión uniforme con los dedos pulgar e índice de ambas manos. Descartar aquellas muestras que presenten rayas.

### **Limpieza química (sala de litografía)**

1. Verificar que el nivel de líquido en el equipo de limpieza con ultrasonido sea adecuado (NUNCA debe encenderse el equipo sin líquido).
2. Depositar las muestras en un vaso de precipitados (utilizando las pinzas) y cubrirlas con acetona. Colocar el vaso de precipitados en la máquina de limpieza con ultrasonido. Encender la máquina durante 4 min.
3. Retirar las muestras del vaso con acetona y colocarlas en otro vaso de precipitados que contenga alcohol isopropílico. Realizar una limpieza en el equipo de ultrasonido durante 4 min.
4. Retirar las muestras del vaso con alcohol isopropílico y colocarlas en otro vaso de precipitados que contenga agua deionizada. Realizar una limpieza en el equipo de ultrasonido durante 4 min.
5. Retirar las muestras del vaso con agua deionizada y secarlas con la pistola de N<sub>2</sub> ubicada en la campana.

6. Verter la acetona y el alcohol isopropílico remanentes en los frascos destinados a tal fin (están bien rotulados), los cuales están ubicados debajo de la campana.
7. Limpiar adecuadamente todos los recipientes utilizados y colocarlos en el secadero.

### Tratamiento con plasma de O<sub>2</sub>

1. Verificar que la manguera de vacío del *plasma cleaner* esté conectada a la línea de vacío.
2. Abrir la tapa del *plasma cleaner* y desmontar la cámara de tratamiento (separarla de su soporte).
3. Encender la bomba de vacío. Colocar las muestras (usando las pinzas) en la cámara de tratamiento y montar la misma en su soporte, realizando un movimiento suave de encastre hasta que el vacío la “atrape”, fijándola en su lugar y evitando el ingreso de aire a través de la unión.
4. Cerrar la tapa del microondas.
5. Abrir la línea de O<sub>2</sub>.
6. Colocar la válvula de 3 posiciones (*Swagelock*) apuntando hacia fuera de la pared (se abre la conexión entre el caudalímetro y la cámara de tratamiento).
7. Abrir la válvula aguja de O<sub>2</sub> hasta alcanzar un caudal de aproximadamente 3 SCFH<sup>1</sup> (es normal que oscile). Esperar aproximadamente un minuto para que el O<sub>2</sub> se distribuya en la cámara de tratamiento.
8. Encender el transformador del microondas (verificar que el cable esté conectado al tomacorriente).
9. Pulsar el botón **TIME COOK** del microondas, luego seleccionar el tiempo e iniciar el tratamiento. Alternativamente, se puede iniciar el programa del microondas pulsando el botón **ADD 30 sec** (30 segundos). Verificar que se emita luz desde la cámara de tratamiento (correspondiente a la formación del plasma). Si esto no ocurre, reducir el caudal de O<sub>2</sub> hasta que se observe la emisión de luz.
10. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, dejar reposar el sistema durante el tiempo necesario (2 min luego de 30 s de tratamiento, 1 min para tratamientos de menor duración).
11. Pulsar el botón **CLEAR/OFF** y repetir los pasos 9 y 10 hasta alcanzar el tiempo total de tratamiento deseado.

---

<sup>1</sup>SCFH : *Standard Cubic Feet per Hour*

12. Finalizado el tratamiento, cerrar la válvula aguja y la llave de O<sub>2</sub>. Luego, apagar la bomba de vacío y mover la llave de 3 posiciones hacia la pared (permitiendo el ingreso de aire).
13. Apagar el microondas pulsando el botón ***CLEAR/OFF***.
14. Dejar el sistema en reposo durante aproximadamente 3 minutos para que se enfríe la cámara de tratamiento (controlar con la mano).
15. Desmontar la cámara de tratamiento, retirar las muestras (usando las pinzas) y depositarlas sobre un papel limpio o contenedor plástico.
16. Montar la cámara de tratamiento en su soporte y cerrar la tapa del equipo.
17. Finalmente, apagar el transformador del *plasma cleaner* y desconectarlo del tomacorriente.

## ***Sputtering***

**Lugar de trabajo:** Edificio de Bajas Temperaturas (sala de *sputtering*)  
/ Sala limpia (sala de *sputtering*)

### **Materiales y equipos:**

1. *Sputter-coater*: Pelco SC-6.
2. Blancos metálicos (Au, Au/Cu, Ag, etc).

### **Protocolo:**

1. Antes de empezar a trabajar, **colocarse un par de guantes de látex**.
2. Ventear la cámara de *sputtering* presionando suavemente hacia un costado el accionador de la válvula que se encuentra en su tapa.
3. Abrir la tapa de la cámara de *sputtering*.
4. Si es necesario, cambiar el blanco<sup>2</sup> que se encuentra montado en el equipo.
5. Colocar la(s) muestra(s) y cerrar la cámara de *sputtering*.
6. Encender el *sputter-coater*. Se encenderá la bomba mecánica.

---

<sup>2</sup>Para cambiar el blanco, retirar en primer lugar la tapa que lo cubre utilizando un destornillador, y apoyarla en una superficie limpia y lisa. Luego, desenroscar cuidadosamente el soporte del blanco. A continuación, extraer el blanco del soporte y colocarlo en el portablancos de papel con el rótulo indicado (los portablancos se encuentran en un recipiente de plástico transparente que debe dejarse a un lado del *sputter-coater*).

7. Esperar a que la presión disminuya hasta aproximadamente 0.04 mbar o hasta que transcurran 4 minutos como máximo.
8. (a) En el edificio de Bajas Temperaturas: abrir completamente la válvula del tubo de Ar y luego abrir la válvula aguja de la línea de Ar. La presión en el manómetro de Ar debe ser de aproximadamente 2.5 psi. En caso contrario, ajustarla con la válvula de regulación (se abre en sentido horario). (b) En la Sala Limpia: abrir la llave de Ar.
9. Abrir la válvula aguja del *sputter-coater* (se abre en sentido antihorario) hasta que la presión alcance 0.8 mbar (la luz de *mb* parpadeará). Dejar bombeando durante 30 s para purgar el sistema.
10. Cerrar la válvula aguja del *sputter-coater* hasta que la presión se estabilice en 0.08 mbar.
11. Para ajustar la corriente, utilizar la perilla de regulación ubicada en la parte trasera del equipo, y verificar que el valor es adecuado pulsando el botón *TEST* que se encuentra en la cara frontal.
12. Para ajustar el tiempo de deposición, **mantener pulsada** la tecla *PAUSE* y luego pulsar las teclas de incremento o decremento.
13. Presionar *START* para comenzar la deposición.
14. Una vez finalizada la deposición, cerrar la válvula aguja del *sputter-coater* (**NO forzarla**).
15. Apagar el *sputter-coater*, ventear la cámara de *sputtering* y retirar la(s) muestra(s).
16. Una vez finalizado el uso del *sputter-coater*, cerrar la cámara de *sputtering* y encender el equipo durante 10 s para lograr cierto grado de vacío.
17. Cerrar la válvula aguja de Ar y la válvula del tubo de Ar.

## Fotolitografía

**Lugar de trabajo:** Sala limpia (sala amarilla).

### **Materiales y equipos:**

1. *Spin-coater*: SPS *Spin150-v3*.
2. Resina fotosensible:  $\mu$ -Posit 1400-31.
3. Líquido revelador: AZ400K.

4. Agua deionizada.
5. Cuentagotas (“gotero”).
6. Plancha calefactora de temperatura regulable.
7. Cronómetro.
8. Pinzas para transportar el sustrato.
9. Máquina alineadora: *SÜSS Microtec MJB4*
10. Campana con pistola de  $N_2$ .

## Protocolo:

### Antes de entrar a la sala amarilla

Verificar que la tapa del conducto de ventilación de la alineadora esté abierta. La misma se encuentra en una habitación del primer piso de la sala limpia, justo frente a la escalera.

### *Spinning*

1. Encender la bomba de vacío (el interruptor se encuentra junto al interruptor de la luz de la sala).
2. Encender la plancha calefactora y establecer la temperatura en 90 °C. Para ello, pulsar en primer lugar el botón “*MENU*” hasta que aparezca en pantalla la información sobre la plancha deseada. Si dicha plancha está inactiva (“-off”), mantener pulsado el botón “*MENU*” para activarla. Luego, configurar la temperatura usando las flechas de incremento y decremento (pulsar para saltos de 1° C o mantener pulsado para saltos de 10° C).
3. Abrir la válvula de vacío conectada al *spin-coater*.
4. Encender el *spin-coater* pulsando el botón de encendido que se encuentra en su parte posterior.
5. Seleccionar el **programa N° 3** del *spin-coater*:  $\omega_{spin} = 5500$  rpm,  $t_{spin} = 60$  s,  $RPM/s = 1000$ . Para ello, pulsar el botón “*PROG*”, luego la tecla “3” y finalmente “enter” (tecla inferior derecha del pad).
6. Abrir la tapa del *spin-coater* y colocar el sustrato sobre la superficie giratoria del mismo (sobre el orificio central conectado al conducto de vacío). Luego, pulsar el botón “*VAC*” para generar vacío.

7. Colocar varias gotas de resina fotosensible sobre el punto central del sustrato, utilizando el cuentagotas. Luego, cerrar la tapa del *spin-coater*. La cantidad de resina debe ser suficiente para cubrir un círculo de diámetro mayor a la mitad del ancho del sustrato.
8. Iniciar el programa de *spinning* pulsando la tecla “I/O”.
9. Una vez finalizado el programa de *spinning*, esperar a que se detenga la rotación y luego levantar la tapa del *spin-coater*. A continuación, pulsar el botón “VAC” para desactivar el vacío y retirar la muestra con las pinzas (sujetar el sustrato por uno de los bordes de manera firme pero sin presión excesiva).
10. Depositar la muestra sobre la plancha calefactora e iniciar el cronómetro. Retirar la muestra de la plancha luego de 3 min y colocarla sobre un papel limpio o contenedor plástico (con la cara cubierta de resina hacia arriba).
11. Cuando todas las muestras hayan sido procesadas, apagar el *spin-coater* y cerrar la válvula de vacío.
12. Limpiar el *spin-coater* remplazando el papel de aluminio por uno limpio y removiendo la resina que quede adherida a las superficies interiores del equipo utilizando un papel embebido en acetona.

### Alineación y exposición

1. Verificar que se encuentra encendida la bomba de vacío (interruptor junto al interruptor de la luz de la sala).
2. Abrir las tres válvulas de servicios (vacío, aire comprimido y N<sub>2</sub>) que se encuentran detrás de la máquina alineadora.
3. Activar el *switch* **rojo** de la máquina alineadora (“*main power*”) y pulsar el botón **ON/OFF** que se encuentra junto a la pantalla de la misma.
4. Pulsar los siguientes botones de la fuente de la máquina alineadora (ubicada debajo de la misma), **en el orden indicado**:
  - a) “ON”.
  - b) “CP” (aparecerá el mensaje “START” en la pantalla).
  - c) “START”.
5. Dejar encendidas la máquina alineadora y su fuente (que permanecerá inactiva durante algunos minutos antes de poder ser utilizada), y empezar la siguiente etapa.

6. Colocar la máscara (fijada sobre un soporte transparente, e.g. de vidrio) sobre un portamáscaras, con la cara que contiene el patrón apuntando hacia arriba. Elegir el portamáscaras de tamaño adecuado, de forma tal que el soporte de la máscara cubra completamente la circunferencia del conducto de vacío.
7. Conectar la manguera de vacío del portamáscaras y verificar que la máscara quede bien adherida.
8. Insertar el portamáscaras en la máquina alineadora.
9. Mover el microscopio (utilizando los tornillos grises verticales) sobre la máscara hasta que la luz quede ubicada sobre el centro del patrón a transferir. Esta etapa sirve para determinar la posición inicial de la muestra antes de la alineación, de forma tal que no sea necesario un ajuste grosero de la misma.
10. Extraer el portamáscaras y sostenerlo con una mano sin desconectar la manguera de vacío. Con la otra mano, colocar la muestra (con la cara cubierta de resina hacia arriba) en el portamuestras de la alineadora, con su centro ubicado lo más aproximadamente posible bajo la luz del microscopio.
11. Volver a insertar el portamáscaras en la alineadora y **fijarlo** mediante los tornillos de ajuste que se encuentran a la derecha del soporte.
12. Seleccionar el menú ***parameters*** en el software del equipo y configurar los parámetros de la exposición (por ejemplo:  $t_{UV} = 10$  s, *align + soft contact*). Luego, volver al menú principal.
13. Cerrar lentamente la ***palanca de contacto***, que se encuentra a la izquierda del tornillo de regulación del WEC. Si la muestra entra en contacto con la máscara mucho antes de que se cierre completamente la palanca de contacto, abrir la palanca y reducir la presión girando el tornillo de regulación del WEC en sentido horario. Repetir este procedimiento hasta que la palanca de contacto pueda cerrarse completamente y el contacto entre la máscara y la muestra sea mínimo o inexistente.
14. En la pantalla deberá aparecer un nuevo menú, desde donde podrá seleccionarse la opción de exposición. Sin embargo, el *software* presenta un *bug* y algunas veces dicho menú no aparece. Si esto ocurre, volver a abrir la palanca de contacto y luego pulsar el botón “*Microscope is down*” en la pantalla (el microscopio ascenderá). A continuación, volver a cerrar la palanca de contacto y, si el nuevo menú no aparece en pantalla, repetir el procedimiento hasta que esto ocurra.
15. Mirando al microscopio, modificar la presión del WEC girando el tornillo hacia la izquierda (aumentar presión) y hacia la derecha (reducir presión) hasta que se observe el contacto entre la máscara y la muestra.

16. Mover la **palanca de alineación** hacia el extremo “*gap*” (en la pantalla aparecerá un mensaje indicando que se inició la alineación). Esto hace que la muestra se aleje un poco de la máscara, permitiendo su movimiento.
17. Realizar la alineación utilizando los tornillos de control de desplazamiento del porta-muestras<sup>3</sup>. El tornillo derecho (mirando la máquina alineadora de frente) controla el desplazamiento en el eje *x* (mirando la muestra desde arriba), mientras que el tornillo izquierdo controla el desplazamiento en el eje *y*. A su vez, existe un tornillo más pequeño ubicado a la derecha, que permite rotar la muestra. Para alinear una máscara con un patrón existente en la muestra, seguir los siguientes pasos:
  - a) Ubicar el campo de visión del microscopio sobre una de las marcas de alineación.
  - b) Realizar una alineación lo más exacta posible utilizando los tornillos de desplazamiento horizontal y vertical y de rotación.
  - c) Mover el campo de visión del microscopio hacia la marca de alineación ubicada en el extremo opuesto (diagonal), y realizar una alineación **utilizando únicamente los tornillos de desplazamiento horizontal y vertical**.
  - d) Mover el campo de visión del microscopio hacia la marca de alineación inicial y realizar una alineación **utilizando únicamente el tornillo de rotación**.
  - e) Repetir los pasos 17c y 17d hasta que la alineación sea suficientemente exacta.
18. Una vez finalizada la alineación, mover la palanca de alineación hacia el extremo “*cont*”.
19. Seleccionar la opción **exposure** en la pantalla táctil, y luego la opción **YES**. Comenzará la exposición.
20. Una vez finalizada la exposición, abrir la palanca de contacto y retirar la muestra y la máscara.
21. Para apagar la alineadora, seguir la siguiente secuencia de pasos:
  - a) Apagar la fuente que se encuentra debajo de la alineadora, pulsando el botón “OFF”.
  - b) Pulsar la tecla “*return*” en la pantalla táctil de la alineadora hasta volver al menú principal (aparecerá el logo “SÜSS Microtec” como fondo de pantalla).
  - c) Pulsar el botón **ON/OFF** que se encuentra junto a la pantalla táctil. Aparecerá el mensaje “Lamp cooling time [...]” en la pantalla, con un contador que durará 600 s.

---

<sup>3</sup>Si el desplazamiento de la muestra resulta obstruido, es posible que la distancia *gap* no sea suficiente. En este caso, reducir la presión con el tornillo de control del WEC hasta que la muestra pueda desplazarse libremente. Finalizada la alineación, volver a ajustar el WEC como se indica en el paso 13.



- d) Una vez finalizado el tiempo de enfriamiento de la lámpara, la máquina alineadora se apagará completamente. En ese momento, girar el *switch* **MAIN** hacia la posición “OFF”.
- e) Finalmente, cerrar las válvulas de servicios (vacío, aire comprimido y  $N_2$ ) que se encuentran detrás de la máquina alineadora.

## Revelado

1. Si el revelador AZ400K se encuentra concentrado, realizar la dilución deseada con agua destilada. Los parámetros de revelado que se exponen a continuación corresponden al revelador en una dilución 1/4.
2. Sumergir la muestra en el líquido revelador contenido en un vaso de precipitados y agitarla suavemente durante 50 s. Este tiempo puede variar según la concentración del revelador, y por lo tanto debe controlarse de forma visual (detener la exposición cuando el patrón de resina se forme de manera adecuada).
3. Retirar la muestra del vaso con líquido revelador y colocarla en otro vaso de precipitados que contenga agua deionizada. Agitar la muestra suavemente durante unos pocos segundos y luego retirarla.
4. Secar la muestra con la pistola de  $N_2$  y depositarla sobre un papel limpio o contenedor plástico.

## Antes de salir de la sala de litografía

1. Limpiar y guardar todos los materiales utilizados.
2. Verificar que la alineadora y su fuente estén apagadas.
3. Verificar que la luz y el extractor de la campana estén apagados.
4. Verificar que todas las válvulas estén cerradas.
5. Apagar la bomba de vacío y finalmente la luz.

## *Reactive Ion Etching (RIE)*

**Lugar de trabajo:** Sala limpia (sala de *sputtering*).

### **Materiales y equipos:**

1. Máquina *RIE*.

2. Muestras con metal depositado.
3. Acetona.
4. Papel.
5. Cronómetro.
6. Pinzas para transportar el sustrato.

### Protocolo:

1. Verificar que la máquina *RIE* esté encendida. La misma **siempre debe permanecer encendida**.
2. Verificar que la válvula de  $SF_6$  esté cerrada.
3. Apagar la bomba de vacío (switch “VACUUM” en controlador *PD-30A*). Esperar hasta que se apague la pantalla “Pfeiffer vacuum”.
4. Abrir la válvula aguja de venteo (aire comprimido). Esperar aproximadamente 10 s.
5. Abrir la válvula de  $N_2$ . Esperar aproximadamente 1 min.
6. Cerrar la válvula aguja de venteo. Esperar aproximadamente 10 s.
7. Abrir cámara de tratamiento. Si está sucia, limpiarla con papel limpio y acetona.
8. Si es necesario, lubricar la tapa de la cámara de tratamiento con grasa para vacío.
9. Colocar la(s) muestra(s) en la parte central de la cámara de tratamiento.
10. Cerrar la cámara de tratamiento.
11. Cerrar la válvula de  $N_2$ .
12. Encender la bomba de vacío.
13. Esperar hasta que la presión sea igual o menor a  $4 \cdot 10^{-5}$  mbar. Entonces, pulsar la tecla **CM** en la pantalla táctil.
14. Esperar hasta que la presión sea igual o menor a  $9 \cdot 10^{-6}$  mbar. Entonces, pulsar la tecla “**zero**” en el controlador de presión *MKS* para setear el cero.
15. Encender sucesivamente las fuentes 1, 2 y 3 pulsando el botón “**POWER**”.
16. Activar el switch de apertura de la válvula de Ar (switch de tres posiciones **hacia arriba**).

17. Pulsar la tecla **GAS4** en la pantalla táctil para activar el flujo de Ar.
18. Pulsar la tecla **D** en el controlador de presión *MKS*. Esperar a que la presión se estabilice en 50 mtorr (presión de generación de plasma).
19. Activar la fuente 2 pulsando el botón **ON/OFF**. Verificar la formación de plasma en el visor de la cámara de tratamiento (gas violeta). Verificar también que la potencia reflejada en la fuente 2 sea igual a 0 W; en caso contrario, realizar una corrección rotando los tornillos grises que se encuentran sobre la cámara de tratamiento.
20. Pulsar la tecla **A** en el controlador de presión *MKS*. Esperar a que la presión se estabilice en 5 mtorr (presión de *etching*). Luego, volver a ajustar la potencia reflejada si es necesario.
21. Realizar el etching **de forma pulsada** siguiendo los siguientes pasos<sup>4</sup>:

- a) Iniciar el *etching* activando la fuente 1 con el botón *ON/OFF*. **Dejar la fuente activada durante 10 s y luego desactivarla pulsando la tecla ON/OFF.**
- b) Dejar la fuente desactivada durante 2 min.

Repetir los pasos anteriores de manera iterativa hasta alcanzar el tiempo total de tratamiento deseado (por ejemplo, 300 s).

22. Una vez finalizado el tratamiento, desactivar la fuente 2 pulsando la tecla **ON/OFF**. Mirar a través del visor de la cámara de tratamiento y verificar que el color violeta del plasma haya desaparecido.
23. Pulsar la tecla **GAS4** en la pantalla táctil para desactivar el flujo de Ar. Se desactivará la opción “GAS4” en la pantalla.
24. Desactivar el switch de apertura de la válvula de Ar (switch de tres posiciones **en el centro**).
25. Apagar sucesivamente las fuentes 1, 2 y 3 pulsando el botón “**POWER**”.
26. Presionar el botón **OPEN** en el controlador de presión *MKS* para abrir completamente la válvula de vacío.
27. Esperar hasta que la presión sea menor o igual a  $5 \cdot 10^{-5}$  mbar.
28. Presionar la tecla **CM** en la pantalla táctil para desactivar el controlador de presión.
29. Repetir los pasos 3 - 7.

---

<sup>4</sup>Esto se puede realizar de manera automática configurando la fuente para que trabaje en modo pulsado. Revisar el cuaderno de operación del *RIE* para más detalles.

30. Verificar que el tiempo de tratamiento haya sido suficiente (debe observarse el patrón correcto sobre el sustrato).
31. Si el tiempo de tratamiento fue insuficiente, cerrar la cámara de tratamiento y repetir los pasos [11](#) - [30](#).
32. Si el resultado es satisfactorio, retirar las muestras y limpiar la cámara de tratamiento.
33. Cerrar la cámara de tratamiento y cerrar la válvula de  $N_2$ .
34. Encender la bomba de vacío y dejar el equipo en ese estado hasta su próximo uso (NO apagar).

## Apéndice V

# Diseño y construcción de un circuito selector de canales para mediciones ECIS

### Planteo del problema

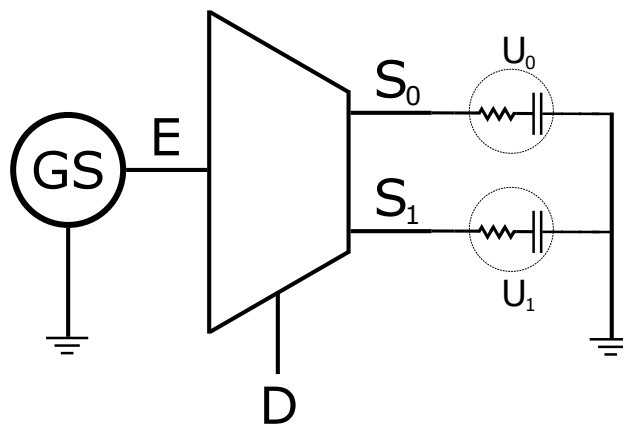
La medición de impedancia eléctrica de un MEA es sencilla de implementar cuando existe un único microelectrodo en el arreglo, independientemente de la duración de la misma. Basta con realizar la conexión de manera adecuada y ejecutar el programa de medición que controla todos los dispositivos involucrados automáticamente. No obstante, en las aplicaciones más importantes de la técnica ECIS en este trabajo (Capítulos [B.3](#) y [C.2](#)), se hizo necesario realizar mediciones de múltiples microelectrodos durante intervalos de tiempo prolongados. Por ejemplo, para determinar un punto de una curva de crecimiento (Figuras [C.1.14](#), [B.2.2](#) y [B.3.2](#), entre otras) en 8 microelectrodos diferentes en paralelo (es decir, simultáneamente), sería necesario disponer de 8 sistemas de medición independientes, ya que la técnica implementada no permite la medición simultánea de dos impedancias.

Una alternativa a las mediciones en paralelo es realizarlas de forma secuencial, es decir, una tras otra, y con intervalos de espera reducidos entre ellas. Esto podría realizarse con un único sistema de medición, modificando las conexiones a medida que se van completando las mediciones correspondientes a cada microelectrodo. Esta estrategia fue adoptada a lo largo de este trabajo, y en un principio se implementó conectando y desconectando los microelectrodos correspondientes de forma manual. No obstante, este procedimiento resultó altamente impráctico, no sólo por la demanda constante de atención por parte del operario, sino además por ser incompatible con mediciones de larga duración (como todas las realizadas en los experimentos de discriminación), ya que eso implicaría la presencia de un operario durante más de 24 horas seguidas trabajando en el experimento. Para superar estas dificultades, se decidió diseñar y construir un dispositivo electrónico que permita seleccionar los microelectrodos

a medir de forma automática mediante *software*.

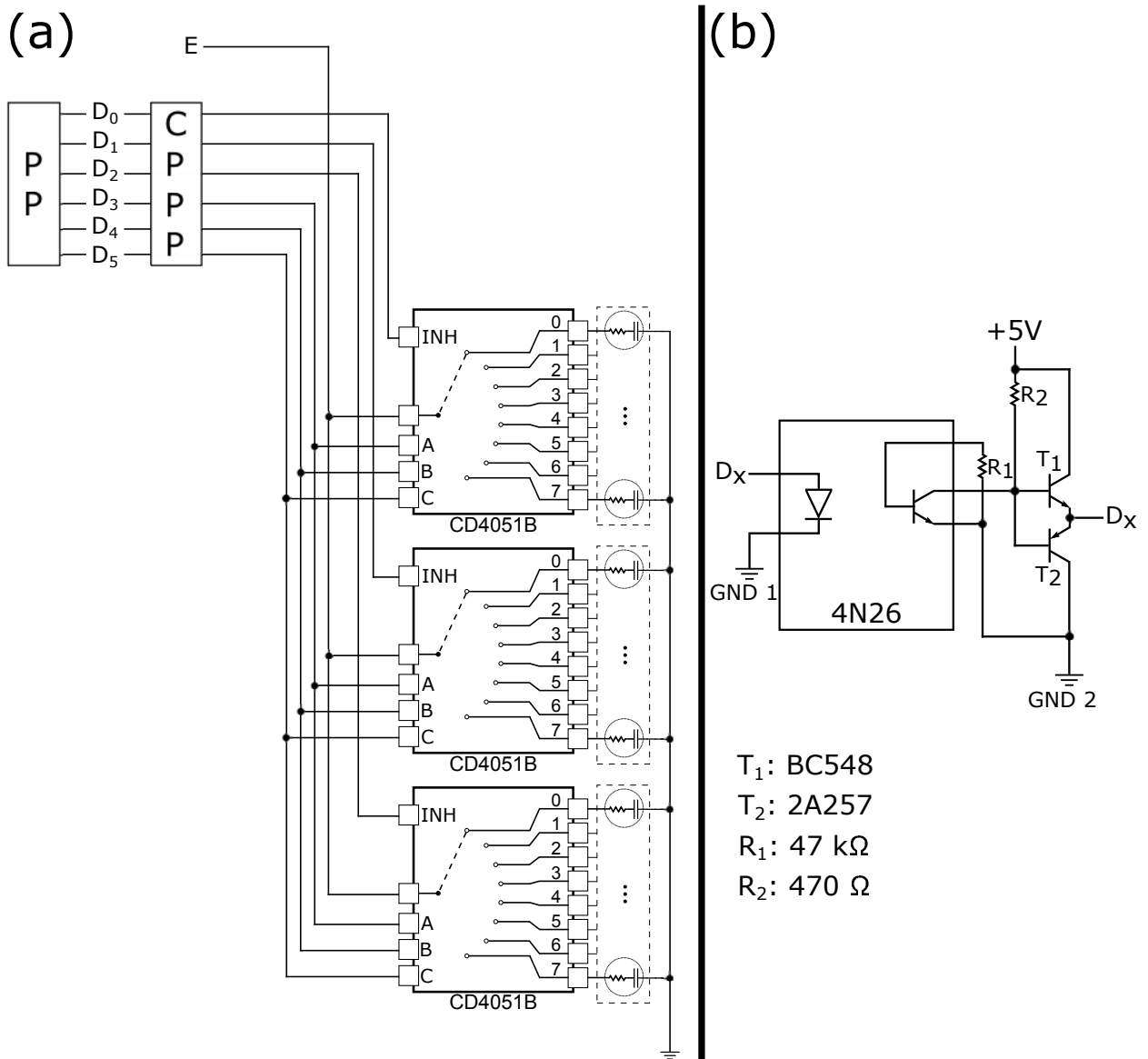
## Diseño del circuito

Teniendo en cuenta las condiciones de medición empleadas en este trabajo, el circuito selector de canales propuesto debe ser capaz de recibir una entrada analógica de amplitud menor o igual a  $2 V_{\text{RMS}}$  (valor máximo utilizado para mediciones en la fase de herida (Capítulo B.2 y Sección B.3.4.3) y frecuencia variable entre 20 Hz y 100 kHz, y conectarla directamente a una de sus múltiples salidas analógicas, con mínima distorsión. Un dispositivo que cumple estas características se denomina demultiplexor, y un esquema de su funcionamiento se muestra en la Figura V.1.



**Figura V.1:** Diagrama esquemático de la selección de microelectrodos mediante un demultiplexor con dos canales de salida. El canal de entrada E recibe la señal a transmitir proveniente del generador de señales (GS en la figura), mientras que los canales  $S_0$  y  $S_1$  representan las salidas del dispositivo, conectadas a dos microelectrodos independientes (representados como circuitos RC serie). La señal digital D se utiliza para seleccionar la salida activa, es decir, cierra el circuito entre la entrada E y alguna de las salidas existentes. Cuando  $D = 0$ , se activa la salida  $S_0$ , y la señal de excitación llega al microelectrodo  $U_0$ , mientras que si  $D = 1$  se activa la salida  $S_1$  y la señal llega al microelectrodo  $U_1$ .

Un demultiplexor que cumple con los requerimientos descritos previamente es el CD4051B de la empresa *Texas Instruments*, el cual posee en total 8 canales de salida. El circuito selector de canales se construyó con tres de estos dispositivos en paralelo, dando un total de 24 canales de salida, como se observa en la Figura V.2. Debido a que los demultiplexores transmiten señales analógicas, se alimentaron con una fuente partida de  $-5 V$  a  $+5 V$ . Para controlar todas las salidas del circuito, se utilizaron 6 canales digitales que se llamaron  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$  y  $D_5$  y que fueron controlados mediante el puerto paralelo de la computadora. Los canales  $D_0 - D_2$  permiten seleccionar una de las 8 salidas de todos los demultiplexores simultáneamente, mientras que los canales  $D_3 - D_5$  activan o desactivan cada demultiplexor, controlando la entrada INH (*inhibit*) de cada uno.

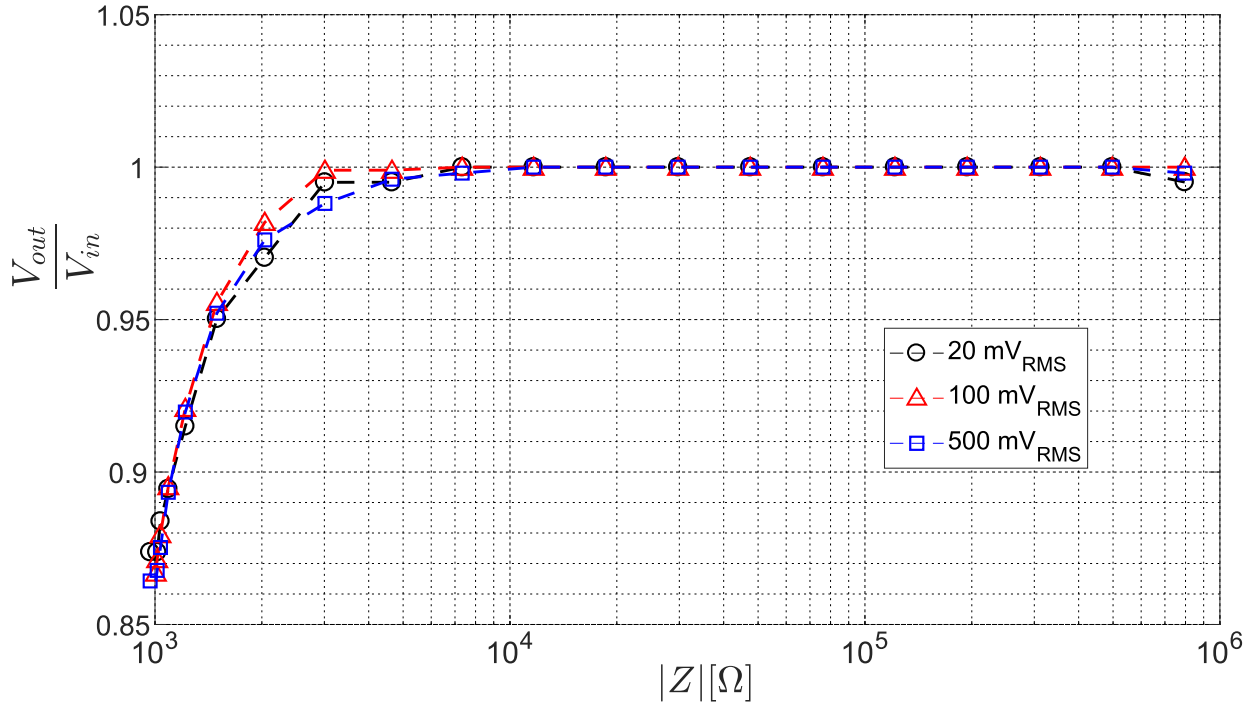


**Figura V.2:** Diagrama esquemático del circuito selector de canales completo. En la Figura (a) se muestran las conexiones correspondientes. La señal  $E$ , proveniente del generador de señales, está conectada simultáneamente a las entradas de todos los demultiplexores. Las señales digitales  $D_0 - D_5$  son transmitidas desde el puerto paralelo de la computadora (PP en la figura) y controlan la salida activa del circuito como se describe en el texto. Entre el puerto paralelo y el arreglo de demultiplexores se instaló un circuito protector (CPPP en la figura) para evitar posibles picos de tensión que dañen el puerto paralelo. Dicho circuito se esquematiza en la Figura (b) para una señal  $D_x$  genérica y su componente principal es un optoacoplador (4N26) que permite separar ambas partes del circuito selector de canales [72]. El circuito de protección completo consiste en un arreglo de 6 circuitos como el representado, y se alimenta con una fuente de 5 V. Las tierras GND 1 y GND 2 corresponden a la computadora y a la fuente, respectivamente.

## Validación experimental

Para verificar el funcionamiento del circuito selector de canales, se realizó una serie de mediciones empleando el esquema de la Figura V.2. En lugar de conectar un microelectrodo

en una de las salidas del CD4051B, se utilizó para tal fin un circuito formado por un resistor en serie con un capacitor. Los valores de esos componentes pasivos se seleccionaron de forma tal que simulen el caso de mínima impedancia de un cultivo celular (máxima corriente de salida en un canal). Se empleó entonces el generador de funciones para aplicar una diferencia de potencial alterna entre los terminales del circuito completo y se registró la caída de potencial en el circuito RC mediante un osciloscopio (TDS2022B, Tektronix). Los resultados se presentan en la Figura V.3.



**Figura V.3:** Ganancia del circuito selector de canales en función del módulo de la impedancia a medir. Por debajo de  $3 \text{ k}\Omega$ , se debe realizar una corrección.

Como puede apreciarse, la distorsión de la señal de salida causada por la presencia del circuito selector de canales es despreciable para impedancias mayores a  $3 \text{ k}\Omega$ , pero se hace importante para valores de impedancia menores. A frecuencias elevadas, la impedancia de los microelectrodos utilizados en esta tesis está entre  $1 \text{ k}\Omega$  y  $4 \text{ k}\Omega$ , por lo que dichas mediciones incorporaron un error adicional debido al circuito selector de canales. Este error fue incorporado en el cálculo del error total que se presenta en el Apéndice II.



# Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud. Cáncer. 2017. <http://www.who.int/topics/cancer/es/>. Accedido: 2017-09-15. 2
- [2] Almeida, C., Barry, S. Cancer: basic science and clinical aspects, cap. 6, págs. 115–134. Wiley-Blackwell, 2010. 3, 4, 5, 6
- [3] Smith, R., Cokkinides, V., Brawley, O. Cancer screening in the united states, 2009: A review of current american cancer society guidelines and issues in cancer screening. *A Cancer Journal for Clinicians*, **59**, 27–41, 2009. 4
- [4] Petticrew, M., Sowden, A., Lister-Sharp, D., Wright, K. False-negative results in screening programmes: systematic review of impact and implications. *Health Technology Assessment*, **4** (5), 1–120, 2000. 4
- [5] National Cancer Institute. Cancer diagnosis. 2017. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>. Accedido: 2017-09-18. 5
- [6] Biller-Andorno, N., Jüni, P. Abolishing mammography screening programs? a view from the swiss medical board. *The New England Journal of Medicine*, **370** (21), 2014. 5
- [7] Oliveira, C., Saraiva, A. Estudo comparativo do diagnóstico de câncer pulmonar entre tomografia computadorizada e broncoscopia. *Radiologia Brasileira*, **43** (4), 229, 2010. 6
- [8] Nelson, H., O'Meara, E., Kerlikowske, K., Balch, S., Miglioretti, D. Evidence summary: False-positive and false-negative rates of digital mammography screening. <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/Page/Document/evidence-summary-false-positive-and-false-negative-rates-of-breast-cancer-screening1>. Accedido: 2017-09-20. 6
- [9] Giaever, I., Keese, C. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **81**, 3761–4, 1984. 8, 21, 29, 57, 59, 107
- [10] Giaever, I., Keese, C. Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behaviour in tissue culture. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **33**, 242–7, 1986. 9, 21, 57, 59, 62, 63, 77

- [11] Lo, C., Keese, C., Giaever, I. Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophysical Journal*, **69**, 2800–7, 1995. [15](#), [34](#), [44](#), [65](#), [104](#), [105](#), [106](#)
- [12] Wegener, J., Sieber, M., Galla, H. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayer cultured on gold surfaces. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **32**, 151–70, 1996. [9](#)
- [13] Wegener, J., Keese, C., Giaever, I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, **259**, 158–66, 2000. [9](#), [34](#), [40](#), [41](#), [42](#), [44](#), [63](#), [104](#), [105](#), [106](#)
- [14] Urdapilleta, E. Respuesta eléctrica de monocapas celulares en cultivos *in vitro*. *Trabajo Especial de la Carrera de Ingeniería Nuclear. Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo/Comisión Nacional de Energía Atómica. San Carlos de Bariloche, Argentina*, págs. 32–60, 2004. [8](#), [9](#), [15](#)
- [15] Bagnaninchi, P., Drummond, N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 6462–7, 2011. [8](#)
- [16] Mueller, J., Thirion, C., Pfaffl, M. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) based real-time measurement of titer dependent cytotoxicity induced by adenoviral vectors in an IPI-2I cell culture model. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 2000–5, 2011. [8](#)
- [17] Keese, C., Wegener, J., Walker, S., I., G. Electrical wound-healing assay for cells *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 1554–9, 2004. [8](#), [18](#), [19](#), [20](#), [40](#), [42](#), [45](#), [48](#), [69](#), [111](#)
- [18] Linderholm, P., Braschler, T., Vannod, J., Barrandon, Y., Brouard, M., Renaud, P. 2D impedance imaging of cell migration and epithelial stratification. *Lab on a Chip*, **6**, 1155–62, 2006. [39](#)
- [19] Mondal, N., Mondal, D., RoyChaudhuri. A simple and sensitive cytosensor based electrical characterization of *in vitro* wound healing assay for keratinocytes. En: IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop (LiSSA), págs. 47–50. 2011. [8](#), [39](#)
- [20] Åberg, P., Nicander, I., Hansson, J., Geladi, P., Holmgren, U., Ollmar, S. Skin cancer identification using multifrequency electrical impedance - a potential screening tool. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **51**, 2097–102, 2004. [8](#), [21](#), [23](#)

- [21] Lovelady, D., Richmond, T., Maggi, A., Lo, C., Rabson, D. Distinguishing cancerous from noncancerous cells through analysis of electrical noise. *Physical Review E*, **76**, 041908, 2007. [17](#), [21](#), [22](#), [60](#), [71](#)
- [22] Das, D., Kamil, F., Biswas, K., Das, S. Electrical characterization of suspended hela cells using ECIS based biosensor. *En: 6<sup>th</sup> International Conference on Sensing Technology (ICST)*, págs. 734–7. 2012. [8](#)
- [23] Bellotti, M. Evaluación biológica y fisicoquímica de dispositivos ecis postulados para el diagnóstico de patologías oculares. *Tesis de Doctorado en Medicina. Universidad Nacional de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina*, 2008. [8](#)
- [24] Bellotti, M., Bast, W., Berra, A., Bonetto, F. A new experimental device to evaluate eye ulcers using a multispectral electrical impedance technique. *Review of Scientific Instruments*, **82**, 074303, 2011. [8](#)
- [25] Borkholder, D. Cell-based biosensors using microelectrodes. *PhD Thesis. Stanford University. Stanford, California, USA*, págs. 51–64, 1998. [9](#), [103](#)
- [26] Bast, W. Desarrollo de arreglos de electrodos micromaquinados para aplicaciones en biotecnología. *Tesis de la Carrera de Doctorado en Física. Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo/Comisión Nacional de Energía Atómica. San Carlos de Bariloche, Argentina*, págs. 23–48, 2014. [9](#), [79](#), [81](#), [86](#), [89](#), [90](#), [107](#), [114](#), [115](#)
- [27] Giaever, I., Keese, C. Micromotion of mammal cells measured electrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **8**, 7896–900, 1991. [9](#), [14](#), [15](#), [16](#), [21](#), [43](#), [57](#), [66](#), [104](#), [105](#)
- [28] Wegener, J., Janshoff, A., Galla, H. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: Comparative analysis of different mammalian cell lines. *European Biophysics Journal*, **28**, 26–37, 1998. [9](#), [111](#)
- [29] Urdapilleta, E., Bellotti, M., Bonetto, F. Impedance analysis of cultured cells: A mean-field electrical response model for electric cell-substrate impedance sensing technique. *Physical Review E*, **74**, 041908, 2004. [15](#)
- [30] Riahi, R., Yang, Y., Zhang, D., Wong, P. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *Journal of Laboratory Automation*, **17**, 59–65, 2012. [18](#)
- [31] Giana, F., Bellotti, M., Bonetto, F. Caracterización del comportamiento dieléctrico de diferentes líneas celulares durante la fase de herida correspondiente a un ensayo de herida-cicatrización empleando la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica celular, 2015. Póster publicado en la 100<sup>a</sup> Reunión de la Asociación Física Argentina. Villa de Merlo, San Luis, Argentina. [21](#), [35](#)

- [32] Rahman, A., Lo, C., Bhansali, S. A detailed model for high-frequency impedance characterization of ovarian cancer epithelial cell layer using ecis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **56** (2), 485–92, 2009.
- [33] Hong, J., Kandasamy, K., Marimuthu, M., Choi, C., Kim, S. Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **56** (2), 485–92, 2009. [21](#)
- [34] Brown, B., Tidy, J., Boston, K., Blackett, A., Smallwood, R., Sharp, F. Relation between tissue structure and imposed electrical current flow in cervical neoplasia. *The Lancet*, **355**, 892–5, 2000. [23](#), [58](#)
- [35] Wilkinson, B., Smallwood, R., Keshtar, A., Lee, J., Hamdy, F. Electrical impedance spectroscopy and the diagnosis of bladder pathology: a pilot study. *The Journal of Urology*, **168**, 1563–67, 2002. [23](#)
- [36] Agilent Impedance Measurement Handbook, págs. 3–4. 4<sup>a</sup> ed<sup>ón</sup>. Santa Clara, CA, USA: Agilent Technologies, 2009. [32](#), [40](#)
- [37] Marx, V. Cell-line authentication demystified. *Nature Methods*, **11**, 483–8, 2014. [34](#)
- [38] [www.atcc.org](http://www.atcc.org). Accedido: 2014-03-06. [34](#)
- [39] Richardson, J., Scalera, V., Simmons, N. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochimica et Biophysica Acta*, **673**, 26–36, 1981. [34](#)
- [40] Diebold, Y., Calonge, M., Enríquez de Salamanca, A., Callejo, S., Corrales, R., Sáez, V., *et al.* Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **44** (10), 4263–74, 2003. [35](#)
- [41] R., O. Glandular epithelial cells from mice: a method for selective cultivation. *Journal of the National Cancer Institute*, **52** (4), 1375–8, 1974. [35](#)
- [42] Urtreger, A., Ladeda, V., Puricelli, L., Rivelli, A., Vidal, M., Delustig, E., *et al.* Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International Journal of Oncology*, **11** (3), 489–96, 1997. [35](#)
- [43] Freshney, R. Culture of animal cells, págs. 71–159. 3<sup>a</sup> ed<sup>ón</sup>. PUBLISHER MISSING, 1994. [36](#)
- [44] URL <http://www.biophysics.com/publications/>. [37](#)

- [45] Yarrow, J., Perlman, Z., Westwood, N., Mitchison, T. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing: a comparison of image-based readouts methods. *BMC Biotechnology*, págs. 4–21, 2004. [39](#)
- [46] Rodriguez, L., Wu, X., Guan, J. Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology*, **294**, 23–9, 2005.
- [47] Környei, Z., Czirók, A., Vicsek, T., Madarász, E. Proliferative and migratory responses of astrocytes to *in vitro* injury. *Journal of Neuroscience Research*, **61**, 421–9, 2000. [39](#)
- [48] Borkholder, D. Cell-based biosensors using microelectrodes. Tesis Doctoral, Stanford University, 1998. [44](#)
- [49] Keese, C., Giaever, I. Automated cell migration assay. [www.biophysics.com/woundhealingpubs.php](http://www.biophysics.com/woundhealingpubs.php), 2013. [45](#)
- [50] Ren, J., Xiao, Y., Singh, L. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Research*, **66**, 3006–14, 2006. [58](#)
- [51] Zudaire, E., Cuesta, N., Murty, V., Woodson, K., Adams, L., Gonzalez, N., *et al.* The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor supressor gene in multiple human cancers. *The Journal of Clinical Investigation*, **118** (2), 640–50, 2008.
- [52] Park, G., Choi, C., English, A., Sparer, T. Electrical impedance measurements predict cellular transformation. *Cell Biology International*, **33**, 429–33, 2009.
- [53] Liu, Q., Yu, J., Xiao, L., Tang, J., Zhang, Y., Wang, P., *et al.* Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 1305–10, 2009.
- [54] Arias, L., Perry, C., Yand, L. Real-time electrical impedance detection of cellular activities of oral cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 2225–31, 2010.
- [55] Hong, J., Kandasamy, K., Marimuthu, M., Choi, C., Kim, S. Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study. *Analyst*, **136**, 237–45, 2011. [58](#)
- [56] Blad, B., Baldetorp, B. Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study. *Physiological Measurement*, **17**, 105–15, 1996. [58](#)
- [57] Almeida, C., Barry, S. Cancer: basic science and clinical aspects, cap. 4, págs. 91–92. Wiley-Blackwell, 2010. [59](#)

- [58] Bellotti, M., Giana, F., Bonetto, F. Impedance spectroscopy applied to the fast wounding dynamics of an electrical wound-healing assay in mammalian cells. *Measurement Science and Technology*, **26**, 085701, 2015. [69](#)
- [59] Press, H., Teukolsky, S., Vetterling, W., Flannery, B. Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing. 2<sup>a</sup> ed<sup>ón</sup>. Cambridge University Press, 1994. [71](#), [128](#)
- [60] Marsland, S. Machine Learning: An Algorithmic Perspective, cap. 10, págs. 221–226. Chapman & Hall/CRC, 2009. [73](#), [74](#)
- [61] Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., *et al.* Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, **17** (6), 520–5, 2001. [75](#)
- [62] Little, R., Siegel, J. Missing data in clinical trials. *The New England Journal of Medicine*, **367**, 2557–8, 2012. [75](#)
- [63] Hufnagel, G. On estimating missing values in Linear Discriminant Analysis - Part I. *Biometrical Journal*, **30**, 69–75, 1988. [76](#)
- [64] Dear, R. A Principal Component missing data method for multiple regression models. Reporte técnico SP-86. Systems Development Corporation. Santa Monica, California, USA, 1959. [76](#)
- [65] Rossi, P., Wright, J., Anderson, A. Handbook of Survey Research, cap. 12, págs. 442–4. Academic Press, 1983. [76](#)
- [66] Franssila, S. Introduction to Microfabrication. 2<sup>a</sup> ed<sup>ón</sup>. Wiley, 2010. [80](#), [83](#), [84](#), [94](#)
- [67] Shun'ko, E., Belkin, B. Cleaning properties of atomic oxygen excited to metastable state  $2s^22p^4(^1S_0)$ . *Journal of Applied Physics*, **102**, 083304, 2007. [85](#), [90](#)
- [68] Tan, L., Jiang, J. Digital Signal Processing: Fundamentals and applications, págs. 715–721. Academic Press, 2013. [93](#)
- [69] De Blasio, B., Rottingen, J., Sand, K., Giaever, I., Iversen, J. Global, synchronous oscillations in cytosolic calcium and adherence in bradykinin-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *Acta Physiologica*, **180**, 335–46, 2004. [104](#), [105](#), [106](#)
- [70] BioPhysics, A. Ecis cultureware<sup>TM</sup> disposable electrode arrays. <http://www.biophysics.com/cultureware.php>, 2017. [110](#)
- [71] Model SR530 Lock-in Amplifier. Sunnyvale, CA, USA: Stanford Research Systems, 2013. [129](#)
- [72] Lenk, J. Handbook of digital electronics. Prentice Hall PTR, 1981. [147](#)

# Publicaciones realizadas en el marco de esta tesis

## Publicaciones con referato

- Giana F., Bellotti M. y Bonetto F. “Assay based on electrical impedance spectroscopy to discriminate between normal and cancerous mammalian cells”. Aceptado para publicación en *Physical Review E*. 2018.
- Giana F., Bonetto F. y Bellotti M. “Gold-copper-based biosensor for impedance analysis of mammalian adherent cells”. *IEEE 8th Latin American Symposium on Circuits & Systems (LASCAS)*. San Carlos de Bariloche, Argentina. 2017. Publicado en *IEEE Xplore* tras su aceptación por parte de dos *reviewers*.
- Bellotti M., Giana F. y Bonetto F. “Impedance spectroscopy applied to the fast wounding dynamics of an electrical wound-healing assay in mammalian cells”. *Meas. Sci. Technol.* 26(2015) 085701 (11pp). 2015.

## Publicaciones sin referato

### Congresos nacionales

- Lozano Negro F., Bellotti M., Giana F. y Bonetto F. “Utilización de dos amplificadores *lock-in* para el estudio del movimiento celular mediante la técnica ECIS”. 102<sup>a</sup> Reunión de la Asociación Física Argentina. La Plata, Buenos Aires, Argentina. 2017.
- Giana F., Bonetto F. y Bellotti M. “Diferencias en el comportamiento dieléctrico de dos líneas celulares epiteliales mediante espectroscopia de impedancia eléctrica celular”. 100<sup>a</sup> Reunión de la Asociación Física Argentina. Villa de Merlo, San Luis, Argentina. 2015.
- Tissone A., Andres P., Giana F. y Bellotti M. “Irradiación de células de mamíferos y posterior medición de sobrevivencia utilizando técnicas espectrales de impedancia

eléctrica”. XII Congreso Argentino de Física Médica, I Congreso de Física Médica de las Américas y I Congreso de Medicina Nuclear y Diagnóstico por Imágenes de la AATMN. Buenos Aires, Argentina. 2014.

- Giana F., Bello L., Bonetto F. y Bellotti M. “Espectroscopia de impedancia eléctrica aplicada al diagnóstico in vitro de células humanas transformadas”. Jornadas Científicas 2014: “Proyectos”. Hospital Zonal Bariloche. San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. 2014.
- Giana F., Rosselló J., Bonetto F. y Bellotti M. “Nueva estrategia de medición aplicada al ensayo de herida y cicatrización en células de mamíferos”. 98° Reunión de la Asociación Física Argentina. San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. 2013.

## **Congresos internacionales**

- Giana F., Bonetto F. y Bellotti M. “Discrimination between normal and cancerous cells using ECIS and artificial intelligence techniques”. 4th conference on impedance-based cellular assays. Edinburgh, Escocia. 2018.
- Giana F., Bonetto F. y Bellotti M. “Spectral impedance measurements during wound healing compared to standard ECIS measurements applied to cell differentiation”. 3rd conference on impedance-based cellular assays. Regensburg, Alemania. 2016.
- Bellotti M., Giana F. y Bonetto F. “Wound-healing process on mammal cells monitored by Electric Cell-substrate Impedance Sensing”. 2nd conference on impedance-based cellular assays. Budapest, Hungría. 2013.



# Agradecimientos

A mi familia, que siempre me apoyó de forma incondicional, a pesar de considerar “locos” algunos de mis emprendimientos. Quiero agradecer de todo corazón a mi madre Betty, a mis hermanos Vanesa y Gabriel, a mi sobrina Ariana, a mis abuelos, tíos y primos. Menciones especiales para mi tía Ana María, quien supo acercarme a la ciencia desde muy pequeño, y para mi abuelo Lucho, el *nerd* de la familia, que siempre me mantuvo entretenido con sus historias, preguntas y respuestas.

A Mauro, Nati y Javo, que estuvieron y están, siempre.

A Mariela y Fabián, quienes confiaron en mí y me brindaron todo su apoyo a lo largo de estos cinco años de trabajo.

A Jota y Nacho, que me enseñaron mucho y amenizaron enormemente el día a día.

A Soledad Bustillo y Antonella Acevedo, por facilitarnos las células NMuMG y LM3, sin las cuales habría sido imposible realizar este trabajo.

A Alejandro Berra, por facilitarnos las células IOBA, y a Julia Tau, por facilitarnos el suero fetal bovino y por enseñarnos un nuevo método de preservación celular.

A los físicos IB13, en especial a Javi, Martín, Johann, Ariel y Leo, con quienes compartí muchas charlas motivadoras y esclarecedoras.

A los excelentes trabajadores del Centro Atómico Bariloche que supieron compartir su experticia para solucionar múltiples problemas surgidos a lo largo de este trabajo: Enrique y Matías (taller de vidrios), Claudio, Fernando y Lucas (laboratorio de ingeniería), Leonardo y Matías (taller de electrónica), Gerardo, Luciano y Pablo (nitrógeno líquido), Pablo y Francisco (taller mecánico), Julián, Leonardo, Pablo, Henry, Mauricio y Manuel (sala limpia).

A Willy Pregliasco, por sus recomendaciones y explicaciones relativas a los aspectos estadísticos de esta tesis.

A Marcela Margutti, por su excelente trabajo coordinando todos los aspectos burocráticos del postgrado.

A los docentes del Instituto Balseiro, especialmente a Guillermo Abramson, Pablo Cantero, Hernán Pastoriza y Damián Dellavale.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme la beca que financió este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos que luchan día a día **defendiendo la educación pública en Argentina**.